



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Evaluación de la respuesta inmune humoral frente al
uso de nanotubos de VP6 de rotavirus como adyuvante
para una vacuna contra el virus Zika compuesta por la
proteína de la envoltura viral**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Arturo LIÑAN TORRES

ASESORES

Dr. Enrique Walter MAMANI ZAPANA

Dra. Laura Alicia PALOMARES AGUILERA (Coasesora)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Liñan, A. (2020). *Evaluación de la respuesta inmune humoral frente al uso de nanotubos de VP6 de rotavirus como adyuvante para una vacuna contra el virus Zika compuesta por la proteína de la envoltura viral*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CODIGO ORCID DEL AUTOR:

Arturo Liñan Torres

0000-0002-6004-7893

CODIGO ORCID DEL ASESOR:

Asesor Interno:

Enrique Walter Mamani Zapana

0000-0003-4127-1248

Asesor Externo:

Laura Alicia Palomares Aguilera

0000-0002-2811-8102

DNI: 46771593

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: Laboratorio de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN: La UNAM a través del proyecto PAPIIT UNAM IT-200418 y CONACyT a través del proyecto CONACyT INFR 300705.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS

Se desarrolló en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el cual está ubicado en Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. Coordenadas: 18.976669, -99.248804.

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

2017-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:07 horas del 25 de febrero de 2020, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **ARTURO LIÑAN TORRES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 016-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL FRENTE AL USO DE NANOTUBOS DE VP6 DE ROTAVIRUS COMO ADYUVANTE PARA UNA VACUNA CONTRA EL VIRUS ZIKA COMPUESTA POR LA PROTEÍNA DE LA ENVOLTURA VIRAL"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ...19..., calificativo: Aprobado con maximo honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **ARTURO LIÑAN TORRES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de febrero de 2020.

Mg. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(PRESIDENTE)

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(MIEMBRO)

Dr. ENRIQUE MAMANI ZAPANA
(ASESOR)

Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Laura A. Palomares. Investigación realizada gracias al proyecto PAPIIT UNAM IT-200418 y CONACyT INFR 300705.

DEDICATORIA

A mis padres, Odilia Torres Bellido y Arturo Liñan Velásquez, por su amor inmenso, pero sobre todo por enseñarme a “nunca rendirme” y heredarme “la fuerza de voluntad inquebrantable”, mi fuente de energía infinita.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora externa y principal de tesis, la Dra. Laura Palomares, por todo su apoyo, su confianza, su paciencia, por sus sabios consejos, por motivarme a mejorar, por ser una inspiración y por darme la oportunidad de crecer en el campo de la virotecnología.

A la Dra. Laura Palomares y al Dr. Tonatiuh Ramírez por haberme aceptado en su grupo de investigación y permitirme realizar este trabajo en el Laboratorio de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

A mi asesor interno, el Dr. Enrique Mamani, por todo su apoyo, por ser mi mentor y quien me ayudó a dar mis primeros pasos en el campo de la virología.

A las Técnico Académico M. C. Martha Contreras y M. C. Vanessa Hernández por todo su apoyo, sus consejos, su paciencia y por capacitarme en diversas técnicas. En especial, a la Técnico Académico M. C. Ruth Pastor, quien además de brindarme su apoyo y su experiencia, fue incondicional para que este trabajo pueda realizarse, y a quien agradezco todas esas conversaciones entretenidas en el bioterio.

Al Ing. Alberto Porras por el tiempo y paciencia dedicada a mi capacitación en el proceso de purificación de los nanotubos de VP6. A la Dra. Mabel Rodríguez por brindarme su apoyo en la obtención de nanotubos de VP6, y por todo su interés en el proyecto, y con ello brindarme de su sabiduría y excelentes consejos.

A Karin Levy y Larisa Campos por su apoyo administrativo.

A todos los miembros del grupo Palomares-Ramírez (GPR) por su apoyo y amistad. En especial a Emmanuel “Chapadrinks” Pichardo, Jocelyn Uribe, Enrique Paz, Violeta Guadarrama, Juan Carlos Rivera, Jaqueline Zúñiga, Esmeralda Cuevas, Ricardo Lizardi, Wendy Meza, Yahel López, Víctor López, Ana Alcalá y Michelle Gutiérrez.

A mis queridos amigos Hugo Castelán y Alejandra Alegría que siempre estuvieron para mí en las buenas y en las malas, me apoyaron, me escucharon, rieron conmigo y sobre todo fueron como mis hermanos.

A la Dra. Egma Mayta por permitirme dar mis primeros pasos de virólogo en su grupo de investigación, el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por acompañarme en mis inicios en el campo de la virología. Gracias a Bernardo Esteban, Joe Hermosilla, Gloria Flores, Lucas Sevilla, Rubén “Pachita” Arancibia y Adrián Quintana. Mención especial a Dilan Suárez y Alys Chávez por su amistad y toda la ayuda brindada durante el proceso de titulación, les estoy eternamente agradecido, saben que cuentan conmigo para lo que necesiten.

A mi familia por todo el apoyo y cariño brindado, en especial a mi tío Héctor Torres y Norma Torres.

A mis buenos amigos del Grupo Galindo, Andrés “Don Dr.” García, Leo Ortiz, Abraham (Kala), Rubén Castorena, Ismael “El güero” Salazar y Manuel Vásquez, por su apoyo, compañía, amistad y hacer que la estancia a lo largo de este proceso sea amena.

A mi alma máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y a mi Escuela Profesional de Genética y Biotecnología por formarme en este maravilloso mundo de la ciencia.

Finalmente, agradecer a mis amigos y compañeros del pregrado, con los cuales compartí muchas alegrías, éxitos, fracasos y múltiples lecciones en lo personal y en el ámbito de la ciencia.

ABREVIATURAS

bacVP6	Baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína VP6
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FPLC	Cromatografía líquida de proteína a alta velocidad
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
NoV	Norovirus
NTVP6	Nanotubos de VP6
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
Proteína E	Proteína o glicoproteína de la envoltura
p-valor (p)	Valor de probabilidad
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RV	Rotavirus
SCI-BV	Sistema de expresión células de insecto-baculovirus
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
TBS	Solución amortiguadora de tris
TBST	Solución amortiguadora de tris con Tween 20 al 0.1%
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbencidina
VIP	Virus inactivado y purificado
VLPs	Partículas pseudovirales
VVA	Virus vivo atenuado
ZikV	Virus Zika

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Virus Zika.....	4
2.1.1. La proteína de la envoltura del virus Zika.....	5
2.1.2. Transmisión, infección y distribución actual del virus Zika.....	6
2.2. Desarrollo de vacunas contra el virus Zika.....	9
2.3. La proteína VP6 y los nanotubos de VP6 de rotavirus	12
2.4. Adyuvantes vacunales	14
2.4.1. Nanotubos de VP6 como adyuvante	16
2.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante la prueba de ELISA.....	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Producción de nanotubos de VP6.....	21
5.2. Purificación de nanotubos de VP6	21
5.3. Intercambio de solución amortiguadora de los nanotubos de VP6	24
5.4. Cuantificación de proteína	26
5.5. SDS-PAGE y Western Blot	26
5.6. Microscopía electrónica de transmisión	28
5.7. Verificación de la pureza e identidad de la proteína E recombinante comercial del virus Zika	29
5.8. Inmunización de ratones	29
5.9. Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	31
5.9.1. Procesamiento de datos y determinación del título de anticuerpos IgG.....	35
6. RESULTADOS.....	36

6.1. Producción y purificación de nanotubos de VP6	36
6.2. Verificación de la pureza e identidad de la proteína E recombinante comercial del virus Zika	43
6.3. Inmunización de ratones y evaluación de la respuesta inmune humoral	44
6.3.1. Primer diseño experimental.....	45
6.3.2. Segundo diseño experimental.....	51
7. DISCUSIÓN	54
8. CONCLUSIONES	60
9. RECOMENDACIONES	61
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
11. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión del ZikV y organización de su genoma.	4
Figura 2. Estructura de la proteína E del ZikV.	5
Figura 3. Epítomos de la proteína E del ZikV identificados mediante anticuerpos monoclonales.	6
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de transmisión del ZikV.	7
Figura 5. Infantes con tamaño típico de la cabeza, y con moderada o severa microcefalia asociada con la infección materna por el ZikV.	8
Figura 6. Mapa mundial actual de áreas con riesgo de infección por el ZikV.	8
Figura 7. Algunas plataformas evaluadas para el desarrollo de una vacuna contra el ZikV.	12
Figura 8. Monómero y trímero de la proteína VP6 del RV.	12
Figura 9. Diagrama de fase de la proteína VP6.	13
Figura 10. Micrografías de estructuras de VP6 obtenidas por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión.	14
Figura 11. Micrografías de estructuras de VLPs de NoV, NTVP6 y la mezcla de ambos, imágenes obtenidas por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión.	16
Figura 12. NTVP6 como adyuvantes de las respuestas inmune humoral y celular específicas de VLPs de NoV.	17
Figura 13. Diseño de diálisis.	25
Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de producción y purificación de los NTVP6.	26
Figura 15. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzo y el sangrado para la colecta de suero de los dos diseños experimentales.	31
Figura 16. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG específicos hacia la proteína E.	34
Figura 17. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG específicos hacia los NTVP6.	34
Figura 18. Ecuación de una curva sigmoide de cuatro parámetros.	35
Figura 19. Gráfica representativa tipo sigmoide de la titulación de anticuerpos.	36
Figura 20. Cromatografía de intercambio aniónico.	37
Figura 21. Cromatografía de exclusión molecular.	38
Figura 22. Evaluación del proceso de purificación de los NTVP6 por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.	39
Figura 23. Western Blot con suero policlonal anti-rotavirus.	40

Figura 24. Micrografías de NTVP6 purificados obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.	41
Figura 25. Micrografías de NTVP6 purificados e intercambiados de solución amortiguadora a PBS.	42
Figura 26. Evaluación de la pureza de la proteína E comercial por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.	43
Figura 27. Western Blot con el anticuerpo policlonal anti-proteína E del ZikV.	44
Figura 28. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones del primer diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de la proteína E (Prot E).	46
Figura 29. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del primer diseño experimental.	47
Figura 30. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6.	49
Figura 31. Títulos de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental.	50
Figura 32. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones del segundo diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de la proteína E.	52
Figura 33. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del segundo diseño experimental.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primer diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.	30
Tabla 2. Segundo diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.	31
Tabla 3. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del primer diseño experimental.	46
Tabla 4. Títulos de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental.	49
Tabla 5. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del segundo diseño experimental.	52

RESUMEN

La infección por el virus Zika (ZikV) puede causar malformaciones congénitas en fetos y el síndrome de Guillain-Barre (SGB) en adultos. Actualmente, no existe una vacuna disponible contra el ZikV. Se han reportado diversos candidatos a vacuna contra este virus y la proteína de la envoltura viral (E) ha sido seleccionada como el principal determinante antigénico. Por otro lado, la proteína estructural VP6 de rotavirus (RV) puede autoensamblarse en estructuras poliméricas tubulares cuando se expresa en sistemas recombinantes. En estudios previos se mostró que los nanotubos de VP6 (NTVP6) de RV tienen un efecto adyuvante sobre la inmunogenicidad de partículas pseudovirales (VLPs) de norovirus (NoV). Con base en los antecedentes, el objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto de los NTVP6 sobre la inmunogenicidad de la proteína E recombinante del ZikV. Para ello, se evaluaron dos diseños experimentales mediante la inmunización de grupos de ratones BALB/c por vía intramuscular con 0.5 µg o 10 µg de proteína E sola o en combinación con 5 o 10 µg de NTVP6. Cada grupo recibió dos dosis (inmunización y refuerzo). Se colectaron muestras de suero a los 116 días post inmunización y se evaluaron a través de la prueba de ELISA. Se observó un efecto positivo de los NTVP6 sobre la producción de anticuerpos IgG específicos hacia la proteína E del ZikV, al duplicar la cantidad de NTVP6 coadministrados, ya que el grupo inmunizado con 10 µg de proteína E y 10 µg de NTVP6 tuvo un título de anticuerpos 1.94 veces mayor que el grupo que recibió 10 µg de proteína E y 5 µg de NTVP6. Sin embargo, bajo la evaluación de los diseños experimentales, no se observó una actividad adyuvante de los NTVP6 sobre la proteína E, debido a que los grupos inmunizados solamente con la proteína E tuvieron mayor o similar título de anticuerpos que los grupos con NTVP6 coadministrados.

Palabras clave: adyuvante, nanotubos, virus Zika, proteína de la envoltura, Rotavirus, VP6, anticuerpos IgG.

ABSTRACT

Zika virus (ZikV) infection can cause congenital malformations in fetuses and the Guillain-Barré syndrome in adults. Currently, there is no vaccine available against ZikV. Several vaccine candidates against this virus have been reported and the viral envelope protein (E) has been selected as the main antigenic determinant. On the other hand, the VP6 structural protein of rotavirus (RV) can self-assemble into tubular polymeric structures when expressed in recombinant systems. Previous studies have shown that RV VP6 nanotubes (VP6NT) have an adjuvant effect on the immunogenicity of norovirus (NoV) virus-like particles (VLPs). Based on these previous reports, the main objective of this work was to determine the effect of VP6NT on the immunogenicity of recombinant ZikV E protein. For this, two experimental designs were followed to immunize groups of BALB/c mice intramuscularly with 0.5 µg or 10 µg of E protein alone or in combination with 5 or 10 µg of VP6NT. Each group received two doses (immunization and boost). Serum samples were collected at 116 days post immunization and evaluated through ELISA test. A positive effect of VP6NT on the production of IgG specific to ZikV E protein was observed by doubling the amount of co-administered VP6NT, since the group immunized with 10 µg of E protein and 10 µg of VP6NT presented an antibody titer 1.94 times higher than the group that received 10 µg of E protein and 5 µg of VP6NT. However, under the evaluation of experimental designs, an adjuvant activity of VP6NT on E protein was not observed, as the groups immunized with only the E protein had higher or similar antibody titers than the groups with co-administered VP6NT.

Keywords: adjuvant, nanotubes, Zika virus, envelope protein, Rotavirus, VP6, IgG antibodies.

1. INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZikV) es transmitido a humanos principalmente a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, pero también se puede transmitir de mujeres embarazadas infectadas hacia el feto a través del coito, y por transfusión sanguínea (Song *et al.*, 2017). Además, se han detectado partículas virales en la leche materna, lo que sugiere un riesgo de transmisión a través de la lactancia materna (Colt *et al.*, 2017).

Durante los brotes y epidemias en Asia y las Américas, la infección por el ZikV se asoció con malformaciones congénitas en el feto y el síndrome de Guillain-Barre en adultos. Las malformaciones congénitas en el feto son únicas para la infección con el ZikV, en comparación con otras infecciones por flavivirus (Zou y Shi, 2017).

La mejor forma de evitar la infección por el ZikV sería mediante vacunación, sin embargo, a la fecha no existe una vacuna disponible contra el ZikV. Diferentes grupos están desarrollando candidatos vacunales contra este virus; algunos estudios han probado la respuesta inmune protectora de candidatos constituidos por el ZikV atenuado o inactivado, partículas pseudovirales (VLPs), subunidades basadas en proteínas recombinantes del virus, vacunas de DNA y de RNA mensajero (RNAm) (Shan *et al.*, 2017a; Larocca *et al.*, 2016; Boigard *et al.*, 2017; Pardi *et al.*, 2017; Richner *et al.*, 2017; Barouch *et al.*, 2017). La proteína de la envoltura (E) del ZikV está involucrada en diferentes etapas del ciclo de replicación/proceso de infección y es el principal determinante antigénico del ZikV, y por estas razones ha sido seleccionada para el desarrollo de los candidatos vacunales (Pimienta-Rodríguez y Fando-Calzada, 2016).

Además del componente antigénico de las vacunas, los adyuvantes son importantes para estimular la respuesta inmune. Un adyuvante se define como un compuesto que mejora la respuesta inmune hacia un antígeno (Malm *et al.*, 2017). Entre los adyuvantes en la formulación de vacunas contra el ZikV destacan sales de aluminio, nanopartículas lipídicas y nanoemulsiones basadas en escualeno (Larocca *et al.*, 2016; Pardi *et al.*, 2017; Richner *et al.*, 2017; Boigard *et al.*, 2017); los cuales no siempre logran la

respuesta inmune protectora o durable (Thoryk *et al.*, 2016), y algunos, inclusive son causantes de efectos adversos (Batista-Duharte, 2012; Pasquale *et al.*, 2015). Por tal motivo, es necesario identificar o desarrollar nuevos adyuvantes que no sean tóxicos, que estimulen la respuesta inmunitaria celular y humoral a largo plazo, que no induzcan autoinmunidad, que sean estables en condiciones de temperatura, pH y tiempo, y que tengan entre otras características ser efectivos para su empleo en vacunas.

Por otro lado, una de las proteínas estructurales del rotavirus (RV), la proteína VP6 ensamblada como nanotubos (NTVP6), ha sido identificada como un buen adyuvante. En el 2011, Blazevic *et al.* reportaron por primera vez la actividad adyuvante de los NTPV6 de RV. Ellos demostraron que el coadministrar NTVP6 con VLPs de norovirus (NoV) induce un incremento en la respuesta inmune contra NoV. En estudios posteriores, el grupo de Timo Vesikari y Vesna Blazevic ha continuado con trabajos que siguieron demostrando la actividad adyuvante de los NTVP6 mediante la observación de una inducción fuerte sobre la respuesta inmune humoral y celular específica contra VLPs de NoV (Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019). Estos hallazgos apoyan el empleo de NTVP6 como adyuvantes cuando el uso de otros adyuvantes no es deseable. Asimismo, nuestro grupo, liderado por la Dra. Laura Palomares y el Dr. Tonatiuh Ramírez del Laboratorio de Bioprocesos y Nanobiotecnología del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), investiga sobre aplicaciones nanobiotecnológicas de los NTVP6, y entre los trabajos publicados, se han realizado aportes al entendimiento de la internalización de los NTVP6 por líneas celulares de monocito y macrófago (Rodríguez *et al.*, 2014).

En relación con lo mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la eficacia de NTVP6 como adyuvante de la respuesta inmune humoral para una vacuna contra el ZikV compuesta por la proteína E. Para ello, se produjeron NTVP6 en el sistema células de insecto-baculovirus, y estos se emplearon junto con proteína E

comercial para inmunizar ratones BALB/c, y determinar si existe actividad adyuvante de los NTVP6 mediante la evaluación de dos diseños experimentales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Virus Zika

El ZikV pertenece al género *Flavivirus* y la familia *Flaviviridae* (Musso y Gubler, 2016). El ZikV es un virus envuelto de simetría icosaédrica, de 50 nm de diámetro, y con genoma de RNA de una sola cadena de sentido positivo. Este virus está formado por una nucleocápside compuesta del RNA genómico y de múltiples copias de la proteína de la cápside (C); y sobre ésta, la bicapa lipídica derivada de la membrana celular del hospedero que lleva 180 copias de la proteína de la membrana viral (M, un producto de la proteína prM escindida) y 180 copias de la glicoproteína viral de la envoltura (E) (Kostyuchenko *et al.*, 2016) (Figura 1A). El genoma del ZikV codifica para las proteínas estructurales C, prM y E, y las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5 (Ávila-Pérez *et al.*, 2018) (Figura 1B).

Las proteínas estructurales están involucradas en la entrada a la célula, fusión con el hospedero y ensamblaje del virión. Las proteínas no estructurales están principalmente involucradas en la síntesis de RNA viral, ensamblaje del virión y la regulación de las respuestas de la célula huésped (Ávila-Pérez *et al.*, 2018).

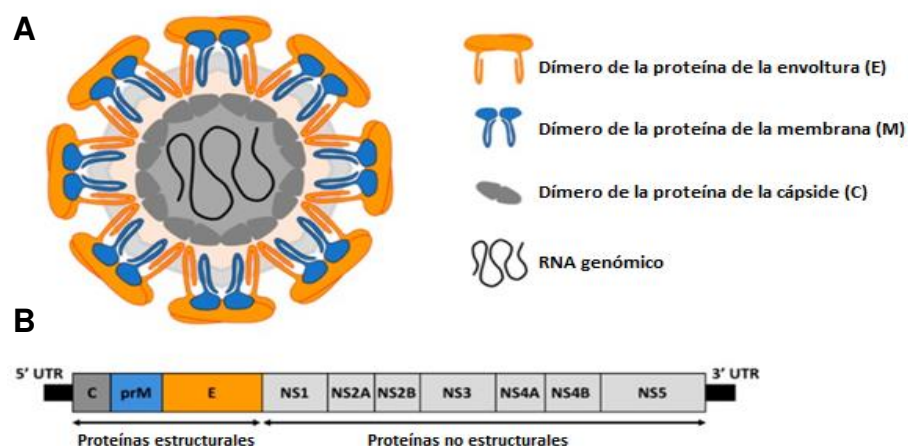


Figura 1. Estructura del virión del ZikV y organización de su genoma. (A) Representación esquemática de la estructura del ZikV. (B) organización genómica mostrando a las regiones que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales (adaptado de Ávila-Pérez *et al.*, 2018).

2.1.1. La proteína de la envoltura del virus Zika

La proteína E está formada por cuatro dominios: tres ectodominios o dominios (DI, DII y DIII) y un dominio transmembrana (TM); y una región troncal (*stem*) (S). El TM y la región troncal están vinculados a los ectodominios mediante un conector (*linker*) corto (Figura 2) (Tai *et al.*, 2018). El dominio I (dominio central) del tipo barril beta se localiza en el medio para unir a los otros dos ectodominios y contiene un sitio de N-glicosilación (Asn154); el dominio II (dominio de dimerización) del tipo dedo extendido contiene el sitio hidrofóbico bucle de fusión (*fusion loop*) (FL) que interactúa con la membrana endosomal después de un cambio conformacional; y el dominio III C-terminal del tipo inmunoglobulina es un segmento polipeptídico continuo y se cree que es importante para unirse a receptores de entrada a la célula (Gong *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018).

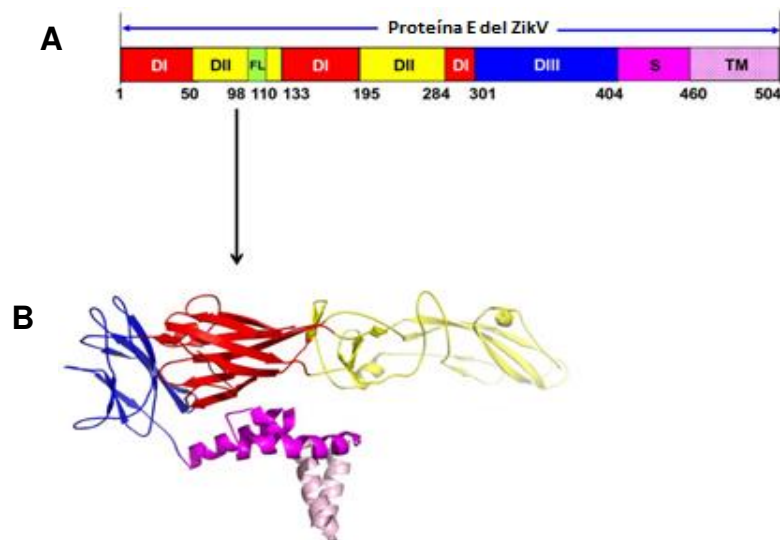


Figura 2. Estructura de la proteína E del ZikV. (A) Estructura esquemática de la proteína E del ZikV. Dominio I (DI), dominio II (DII), dominio (III), bucle de fusión (FL), región troncal (S), y dominio transmembrana (TM). (B) Estructura del monómero de la proteína E del ZikV. DI está en rojo, DII en amarillo, DIII en azul, región troncal en magenta, y TM en rosado (adaptado del material suplementario de Tai *et al.*, 2018).

La proteína E se encuentra formando dímeros en la partícula viral madura. Algunos epítopos de la proteína E están presentes en el monómero y otros son dependientes del dímero. Entre los epítopos monoméricos están el del bucle de fusión en el DII (DII-FL),

y el de la cresta lateral (*lateral ridge*) (LR) en el DIII (DIII-LR). Dentro de los epítomos diméricos, se ha descrito al “epítomo dependiente del dímero de la proteína E” (EDE), el cual se basa en sitios en DII en un monómero, y en residuos en DI y DIII presentes en el otro monómero; otro epítomo conformacional se forma entre la interfase de los DII de un dímero de proteína E. Otro epítomo está formado por residuos en DI y DII de un monómero, sin embargo, este se halló dentro de un dímero de proteína E. Otros epítomos son interdiméricos, uno está formado principalmente por sitios en DIII de dos dímeros adyacentes, y también, por sitios en DI; y otro, se forma entre dos dímeros adyacentes a través de sus DII (Figura 3). Todos los epítomos descritos inducen anticuerpos neutralizantes, excepto el epítomo DII-FL, debido a que este es parcialmente accesible en una partícula viral madura, y, por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra este epítomo no cumplirían con la estequiometría de unión suficiente para neutralizar al virión (Wang *et al.*, 2016; Fernandez y Diamond, 2017; Diamond *et al.*, 2019).

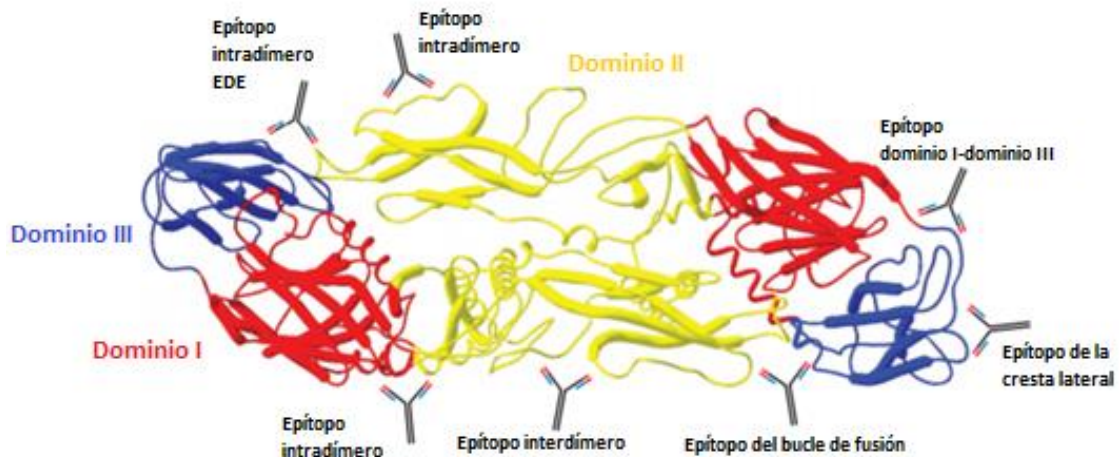


Figura 3. Epítomos de la proteína E del ZikV identificados mediante anticuerpos monoclonales. Todos los epítomos mostrados representan regiones candidatas para el diseño de una vacuna protectora contra el ZikV, excepto el epítomo de la región del bucle de fusión (adaptado de Diamond *et al.*, 2019).

2.1.2. Transmisión, infección y distribución actual del virus Zika

El ZikV (arbovirus) es transmitido a humanos principalmente a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados (Figura 4). El ZikV ha sido aislado de semen,

orina, saliva, líquido amniótico, leche materna y líquido cefalorraquídeo de humanos (Du *et al.*, 2019). El ZikV puede ser aislado de sangre humana hasta diez días después de la infección, en promedio. Algunos reportes indican que este virus puede permanecer en orina por doce o más días después de la infección, y en semen por más de sesenta días (Lessler *et al.*, 2016). Debido a esto, el ZikV también se puede transmitir de manera vertical de mujeres embarazadas infectadas hacia el feto, y de manera horizontal a través del coito, transfusión sanguínea (Song *et al.*, 2017), y, al detectarse partículas virales en la leche materna, existe un riesgo potencial de transmisión a través de la lactancia (Figura 4) (Colt *et al.*, 2017).



Figura 4. Representación esquemática del ciclo de transmisión del ZikV (adaptado de Blázquez y Saiz, 2016).

Las infecciones con el ZikV son sintomáticas solo en el 20-25% de individuos infectados, los que desarrollan una enfermedad leve y autolimitada, con un periodo de incubación entre 4-10 días (Song *et al.*, 2017).

Durante los brotes y epidemias en Asia y las Américas, la infección por el ZikV se asoció con afecciones del sistema nervioso, como el síndrome congénito por el ZikV, caracterizado por malformaciones congénitas en fetos, incluyendo microcefalia (Figura 5), y el síndrome de Guillain-Barré (SGB) en adultos, como consecuencias más graves (Méndez *et al.*, 2017; Zou y Shi, 2017).



Figura 5. Infantes con tamaño típico de la cabeza, y con moderada o severa microcefalia asociada con la infección materna por el ZikV (tomado de NCBDDD-CDC, 2016).

En el 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al ZikV como una emergencia de salud pública de interés internacional (Calvet *et al.*, 2016; Lessler *et al.*, 2016). Actualmente ya no es considerado una emergencia internacional, pero el cambio en la designación no significa una disminución de su importancia, ya que podrían ocurrir nuevas epidemias con consecuencias graves (Garg *et al.*, 2018). En la figura 6 se muestra la distribución del riesgo de infección con el ZikV al 27 marzo del 2019.

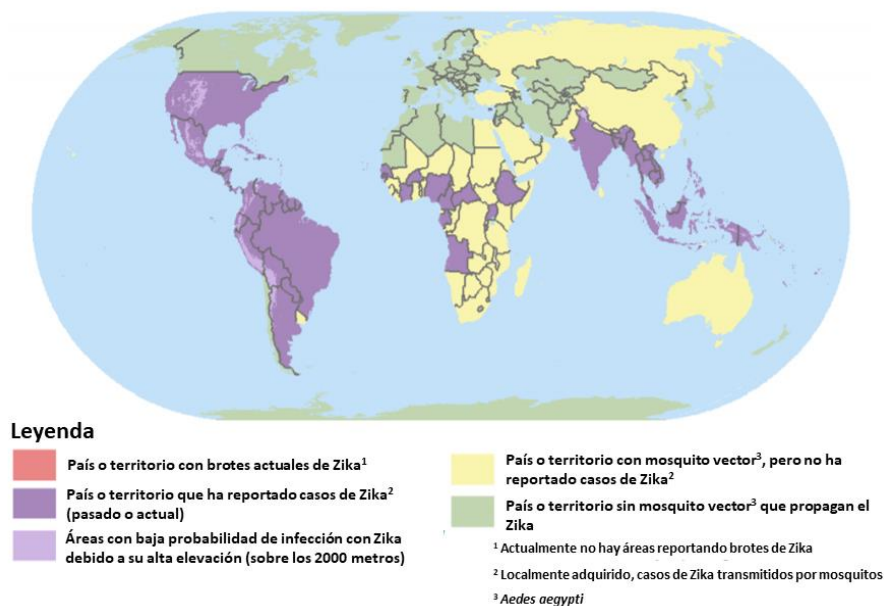


Figura 6. Mapa mundial actual de áreas con riesgo de infección por el ZikV (adaptado de CDC, 2019).

2.2. Desarrollo de vacunas contra el virus Zika

Actualmente no existe una vacuna comercial aprobada contra el ZikV, pero se tienen varios candidatos en evaluación. Entre las primeras plataformas empleadas para candidatos vacunales contra el ZikV, se encuentran las vacunas de DNA. Todos los candidatos utilizan las secuencias nativas o con modificaciones que codifican a las proteínas prM y E, y en algunos casos incluyen secuencias de otros genes (Garg *et al.*, 2018). Larocca *et al.* (2016) demostraron por primera vez que una vacuna de DNA que expresa las proteínas prM y E fue inmunogénica y brindó protección en ratones.

Por otra parte, están las vacunas de virus inactivados y purificados (VIP), las cuales suelen ser más inmunogénicas que las vacunas de DNA (Garg *et al.*, 2018). El Ejército Walter Reed de los Estados Unidos de América evaluó vacunas de VIP del ZikV en humanos y determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes, y que, al transferirlos a ratones, estos ofrecieron protección después del reto (Modjarrad *et al.*, 2018).

Por otro lado, la experiencia de vacunas de virus vivo atenuado (VVA) comerciales contra otros *Flavivirus* como el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV) sugieren que esta plataforma de vacunas probablemente será efectiva contra el ZikV (Garg *et al.*, 2018). Shan *et al.* (2017a) desarrollaron una vacuna de VVA del ZikV mediante la delección de 10 nucleótidos en la región UTR 3' del genoma viral, la cual indujo títulos altos de anticuerpos neutralizantes en ratones y protección en monos Rhesus; además se determinó que esta vacuna reduce la transmisión vertical en ratones preñados, y previene daño testicular (Shan *et al.*, 2017b).

Otra plataforma empleada es la basada en vacunas de subunidades. Debido a que la proteína E es el principal antígeno para la inducción de una respuesta neutralizante contra el ZikV, diversos candidatos de vacunas de subunidades han incluido a esta proteína o parte de ella dentro de sus diseños experimentales. To *et al.* (2018) produjeron parte de la proteína E del ZikV (1-408 aa) junto a toda la secuencia de la proteína prM, y al inmunizar ratones, en combinación con adyuvante, obtuvieron

anticuerpos neutralizantes y protección contra el ZikV. Tai *et al.* (2018) fusionaron la región del ectodominio III de la proteína E del ZikV a la región C-terminal de la región Fc de un anticuerpo IgG humano, y con este inmunógeno obtuvieron anticuerpos neutralizantes y protección contra el ZikV en ratones. Yang *et al.* (2017) produjeron una vacuna basada en el ectodominio III de la proteína E del ZikV y obtuvieron anticuerpos neutralizantes y producción de citoquinas Th1 y Th2 en ratones. Qu *et al.* (2018) produjeron dos vacunas de subunidades, una basada en el DIII, y otra, en el 80% de la región N-terminal de la proteína E del ZikV, ambos candidatos indujeron respuestas inmunes humorales y celulares adaptativas. Zhu *et al.* (2018) evaluaron una vacuna basada en 450 aa de la región N-terminal de la glicoproteína E del ZikV, ésta indujo protección a largo plazo y protegió a ratones contra la microcefalia. Asimismo, Han *et al.* (2017) y Liang *et al.* (2018) produjeron candidatos basados en la proteína E del ZikV y obtuvieron respuestas inmunes y protección contra el ZikV.

Otros candidatos se basan en VLPs, las cuales son estructuras multiméricas formadas a partir de proteínas estructurales virales que mimetizan la organización y conformación de un virus nativo, pero carecen de genoma viral (Roldao *et al.*, 2010). Garg *et al.* (2017) desarrollaron candidatos de VLPs, el primero basado en las proteínas prM y E, y el segundo, basado en las proteínas C, prM y E; y los compararon con vacunas de DNA que codificaban las dos mismas combinaciones de proteínas; y obtuvieron una mejor respuesta inmune mediante las VLPs. Las VLPs formadas por las proteínas C, prM y E indujeron mayores títulos de anticuerpos neutralizantes que la VLPs solo constituida por las proteínas prM y E.

Por otra parte, las vacunas de RNAm son otra plataforma empleada para el desarrollo de candidatos vacunales, y a diferencia de las vacunas de DNA, poseen riesgo mínimo de integración en el genoma del hospedero (Garg *et al.*, 2018). Pardi *et al.* (2017) desarrollaron un candidato de RNAm codificante para las proteínas prM y E del ZikV encapsulado en nanopartículas lipídicas, con el cual obtuvieron respuesta inmune

humoral y celular, y anticuerpos neutralizantes en primates no humanos, además observaron que el candidato confería protección en ratones y primates no humanos.

Con otros candidatos se han empleado plataformas basadas en vectores virales de adenovirus (Ad), virus vaccinia (VACV), virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del sarampión (MeV), que codifican principalmente para las proteínas prM y E (Garg *et al.*, 2018; Diamond *et al.*, 2019). Otro candidato se basa en péptidos de la saliva de mosquitos transmisores, con lo cual se busca obtener una vacuna profiláctica contra el ZikV y otros patógenos (Haque *et al.*, 2018). Además de los candidatos vacunales profilácticos mencionados, también se han desarrollado y evaluado candidatos de vacunas terapéuticas basados en anticuerpos monoclonales contra el ZikV (Barret, 2018).

En la actualidad, algunos de los candidatos se encuentran en ensayos clínicos. Siete candidatos basados en el ZikV completo inactivado, cuatro candidatos basados en vacunas de DNA que codifican para las proteínas prM y E del ZikV, dos candidatos basados en vectores virales que codifican principalmente para las proteínas prM y E del ZikV, y un candidato basado en péptidos de la glándula salival del mosquito vector están en ensayos clínicos de fase I; por otro lado, un candidato basado en una vacuna de RNAm que codifica para las proteínas prM y E del ZikV y un candidato basado en una vacuna de DNA que codifica para las proteínas prM y E del ZikV están en ensayos clínicos de fase II (WHO, 2019). Todos los candidatos que están siendo evaluados en ensayos clínicos, incluyen a la proteína E del ZikV, con excepción de la vacuna contra el mosquito vector (WHO, 2019).

En la figura 7 se muestran algunas plataformas evaluadas para el desarrollo de una vacuna contra el ZikV.

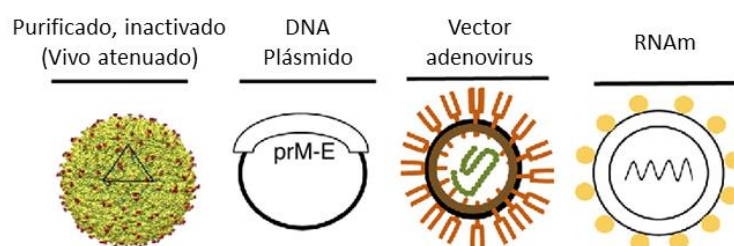


Figura 7. Algunas plataformas evaluadas para el desarrollo de una vacuna contra el ZikV (adaptado de Fernandez y Diamond, 2017).

2.3. La proteína VP6 y los nanotubos de VP6 de rotavirus

El RV pertenece al género *Rotavirus* y la familia *Reoviridae* (Estes y Cohen, 1989). La proteína VP6 de RV es codificada por el segmento 6 del genoma del RV, y constituye más del 50% del contenido proteico total del RV (Estes y Cohen, 1989). La proteína VP6 es la proteína más inmunogénica del RV (Burns *et al.*, 1996), y anticuerpos dirigidos contra VP6 pueden interferir con el ciclo de replicación viral (Corthésy *et al.*, 2006).

El monómero de proteína VP6 está formado por dos dominios: dominio B y dominio H. El dominio B se encuentra en la base de la proteína, consiste en 8 α -hélices, y hace contacto con la proteína VP2; y el dominio H se encuentra en la parte superior de la proteína, está formado por hojas β -plegadas, y hace contacto con la proteína VP7. La proteína VP6 se ensambla en trímeros, que constituyen la unidad que posteriormente se ensambla para formar la capa intermedia del virus. El trímero de VP6 es estabilizado por fuertes interacciones hidrofóbicas en el dominio B (Mathieu *et al.*, 2001); y, por un ion Zn^{2+} localizado en el centro de la molécula, el cual está coordinado por los residuos histidina 153 y serina 339 de cada monómero (Figura 8) (Erk *et al.*, 2003).

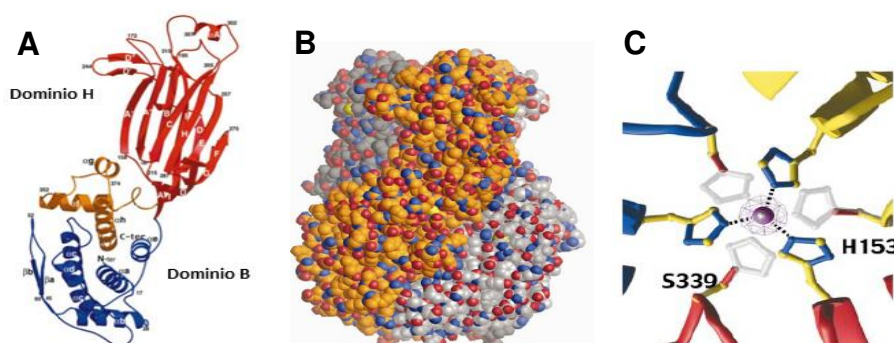


Figura 8. Monómero y trímero de la proteína VP6 del RV. (A) Monómero de la proteína VP6. Dominio H en rojo (residuos 151-331), y dominio B formado por los segmentos en azul (residuos 1-150) y en dorado (residuos 331-397). (B) Vista lateral del trímero de la proteína VP6. (C) Sitio de unión a zinc en el trímero de la proteína VP6, coordinado por los residuos His153 y Ser339 de cada monómero (adaptado de Mathieu *et al.*, 2001).

Una de las características más importantes de la proteína VP6 de RV es su polimorfismo estructural, por el cual puede autoensamblarse en diferentes tipos de estructuras dependiendo principalmente de las condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de cationes divalentes en el medio. En ausencia de cationes divalentes, el pH es el parámetro principal que controla el estado polimórfico de la proteína VP6. En el intervalo de pH entre 3.0-5.5, se obtienen nanoesferas heterogéneas en tamaño, pero en su mayoría presentan 75 nm de diámetro; en el intervalo de pH entre 5.5-7.0, se observan nanotubos anchos que presentan un diámetro de 75 nm y varios micrómetros de longitud; y por encima de un pH de 7.0, se observan nanotubos estrechos que presentan un diámetro aproximado de 45 nm y varios micrómetros de longitud. A valores de pH muy ácidos (<3) o concentraciones de cationes divalentes (Ca^{2+} o Zn^{2+}) por encima de 200 mM, solo se observan trímeros de VP6 (Figura 9, Figura 10) (Lepault *et al.*, 2001).

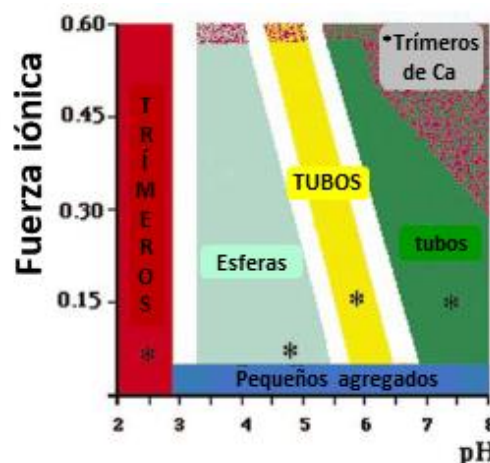


Figura 9. Diagrama de fase de la proteína VP6. Rojo: trímeros, verde claro: nanoesferas, amarillo: nanotubos anchos (75 nm), verde oscuro: nanotubos estrechos (45 nm). A concentraciones mayores a 200 mM de CaCl_2 o ZnCl_2 , se obtienen trímeros. Los asteriscos representan condiciones en las que un tipo particular de estructura puede ser considerada como constituyente único (adaptado de Lepault *et al.*, 2001).

Los nanotubos de VP6 presentan un arreglo hexagonal típico en su superficie, el cual está formado por las interacciones entre trímeros. Se sugiere que la unidad repetitiva de los nanotubos es en un dímero de trímeros de VP6, y además se sabe que la superficie lateral del trímero, implicada en los contactos inter-trímero, está cargada negativamente. Si consideramos un modelo simple para el proceso de ensamblaje de VP6, que solamente un residuo es responsable del proceso, y que, dependiendo del pH, hasta tres residuos pueden ser cargados, podemos suponer que el ensamblaje de nanoesferas, tubos anchos y tubos estrechos requiere trímeros con tres, dos y una subunidad neutral, respectivamente (Mathieu *et al.*, 2001; Lepault *et al.*, 2001).

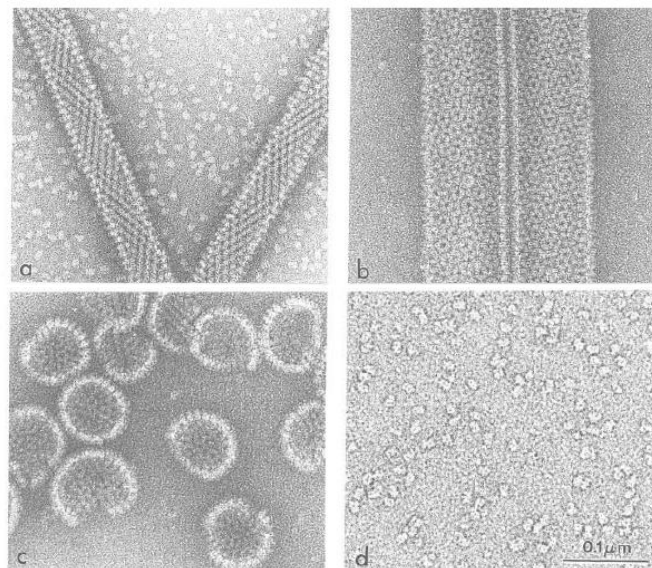


Figura 10. Micrografías de estructuras de VP6 obtenidas por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión. (a) Nanotubos estrechos (45 nm). (b) Nanotubos anchos (75 nm). (c) Nanoesferas. (d) Trímeros de VP6 (tomado de Lepault *et al.*, 2001).

2.4. Adyuvantes vacunales

Un adyuvante se define como un compuesto que mejora la respuesta inmune frente a un antígeno vacunal (Awate *et al.*, 2013). De manera general, los adyuvantes pueden actuar como depósitos o vehículos de entrega (sales minerales, emulsiones, liposomas, virosomas, micro/nanopartículas de polímeros) y/o agentes inmunomoduladores (ligandos a TLR, citoquinas, saponinas, exotoxinas bacterianas) (Gulce-Iz y Saglam-

Metiner, 2019; Malm *et al.*, 2017). Se sugiere que un adyuvante emplea uno o más de los siguientes mecanismos para potenciar la respuesta inmune: 1) liberación sostenida de antígeno en el sitio de inyección (efecto de depósito); 2) sobre regulación de citoquinas y quimioquinas; 3) reclutamiento celular en el sitio de inyección; 4) incrementa la captación y presentación de antígeno en células presentadoras de antígeno (APC); 5) activación y maduración de APC (incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y de moléculas coestimuladoras), y migración a los ganglios linfáticos drenantes; y, 6) activación del inflamosoma (Awate *et al.*, 2013).

Entre los adyuvantes aprobados y empleados en vacunas para humanos, se tienen a las sales de aluminio, una emulsión de aceite en agua (AS03: α -tocoferol, escualeno y polisorbato 80), una combinación de monofosforil lípido A (MPL) y sales de aluminio (AS04), una emulsión de agua en aceite basada en escualeno (MF59), y los virosomas (VLPs compuestos de proteínas de envoltura viral con lípidos de membrana y glicoproteínas virales) (Sun y Xia, 2016; Apostólico *et al.*, 2016). Estos adyuvantes no siempre son capaces de inducir respuestas inmunes diversas, protectoras o durables para proteger contra enfermedades crónicas y emergentes (Mbow *et al.*, 2010; Thoryk *et al.*, 2016), y algunos han sido cuestionados como causantes de efectos adversos (Batista-Duharte, 2012; Pasquale *et al.*, 2015). Por tal motivo, es necesario identificar o desarrollar nuevos adyuvantes que cumplan con las siguientes características: estabilidad en ambientes ácidos, básicos y enzimáticos, y estabilidad a través del tiempo y a diferentes temperaturas; liberación constante del antígeno retenido o ácido nucleico; inducción de inmunidad sistémica y de mucosas; balance entre inmunidad efectiva y tolerancia inmunológica a dosis altas; estimulación de la respuesta inmunitaria celular y humoral a largo plazo; incremento de la inmunogenicidad de antígenos débiles; causar mínimos efectos secundarios locales y sistémicos; utilizable en una amplia variedad de vacunas; estabilidad y facilidad de producción; promover la internalización del antígeno dentro de APC; no incitar una respuesta dominante a sí mismo; ser efectivos para

poblaciones de adultos mayores, poblaciones inmunológicamente hiposensibles, y personas inmunocomprometidas; no generar efectos adversos en poblaciones pediátricas; no ser tóxicos (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, pirógenos); y que no induzcan autoinmunidad (Gulce-Iz y Saglam-Metiner, 2019; Scheinberg *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019).

2.4.1. Nanotubos de VP6 como adyuvante

En el 2011, Blazevic *et al.* presentaron un trabajo que tenía por objetivo proponer un candidato a vacuna combinada contra dos virus que causan gastroenteritis. En este trabajo, se mezclaron 10 µg de VLPs de NoV y 10 µg de NTVP6 de RV (Figura 11), y con dicha mezcla inmunizaron a ratones BALB/c. Los resultados mostraron que esta mezcla indujo fuerte respuesta inmune humoral contra NoV y RV, y no hubo interferencia de la respuesta a ninguno de los antígenos administrados en combinación; por el contrario, observaron un efecto adyuvante por parte de los NTVP6 de RV en las respuestas inmunes humorales específicas contra NoV (Blazevic *et al.*, 2011). En el trabajo de Blazevic *et al.* (2016) se evidencia mejor que los NTVP6 (10 µg) son adyuvantes cuando se emplean dosis subóptimas de VLPs de NoV (0.3 µg).

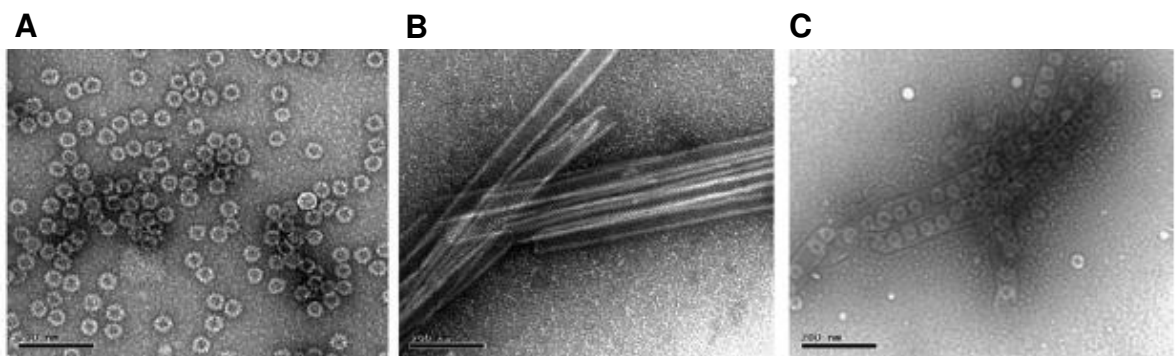


Figura 11. Micrográficas de estructuras de VLPs de NoV, NTVP6 y la mezcla de ambos, imágenes obtenidas por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión. (A) VLPs de NoV formadas por la proteína VP1 de NoV. (B) NTVP6. (C) Mezcla de VLPs de NoV y NTVP6. Se puede observar que los NTPV6 están llenos de las VLPs (tomado de Blazevic *et al.*, 2011).

Hasta el 2016, el efecto adyuvante de los NTVP6 sobre las VLPs de NoV se observó sobre las respuestas inmunes humorales de anticuerpos IgG totales (Figura 12A), IgG1, IgG2a y anticuerpos bloqueantes específicos de la cepa de las VLPs de NoV que se empleó para la inmunización, así como también para otras cepas no incluidas en la inmunización (anticuerpos de reactividad cruzada) (Blazevic *et al.*, 2011; Blazevic *et al.*, 2016).

Por otro lado, en el 2017, se reportó por primera vez la actividad adyuvante de los NTVP6 sobre la respuesta celular T (Th1) específica de VLPs de NoV, mediante la detección de un incremento en la producción de IFN- γ por células del bazo, al emplear NTPV6 como adyuvante (Figura 12B) (Malm *et al.*, 2017).

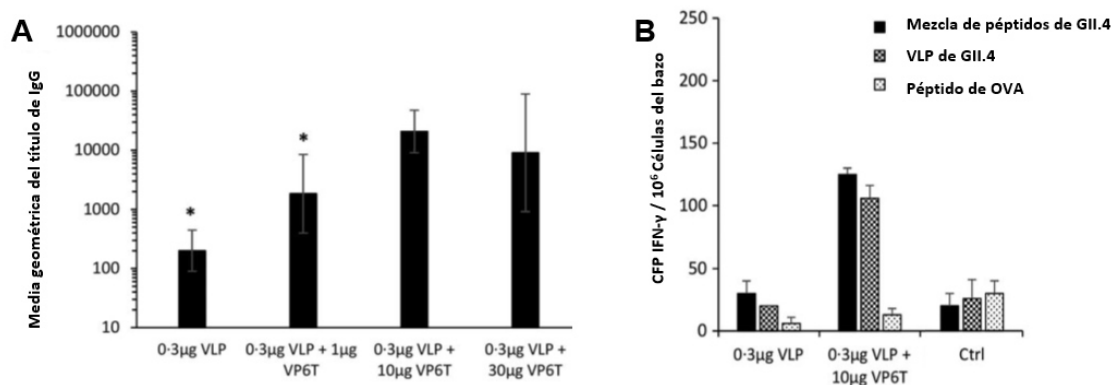


Figura 12. NTVP6 como adyuvantes de las respuestas inmune humoral y celular específicas hacia las VLPs de NoV. A) Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG específicos de VLPs de NoV (VLP). * Diferencias significativas ($p < 0.05$) al compararse con el grupo que recibió 0.3 μ g de VLP + 10 μ g de NTVP6 (VP6T). B) Células formadoras de puntos de Interferón gamma (CFP IFN- γ) por 10^6 células del bazo. Resultado obtenido mediante la prueba de ELISPOT. Se empleó una mezcla de péptidos y VLPs de la cepa GII.4 de NoV como estímulos positivos para las células del bazo, y como control negativo se empleó péptido de ovoalbúmina (OVA). "Ctrl" corresponde al grupo que fue inoculado solo con PBS (adaptado de Malm *et al.*, 2017).

En el 2016, se reportó que los NTVP6 actúan como inmunomoduladores y vehículos de entrega para respuestas inmunes contra VLPs de NoV, mediante estudios *in vitro* en células de macrófago. Como inmunoestimulador, se observó que los NTVP6 inducen la

activación y maduración de macrófagos mediante la sobrerregulación de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), expresión del MHC II, liberación de mediadores inflamatorios (TNF- α); por lo que aumenta la acción de células del sistema inmune innato y adaptativo. Como vehículo de entrega, se observó que los NTVP6 aumentan la internalización de las VLPs de NoV en un 30% (Malm *et al.*, 2016).

Posteriormente, se emplearon una dosis subóptima (0.3 μ g) de VLPs de NoV y distintas cantidades de NTVP6 (1 μ g, 10 μ g y 30 μ g) (Figura 12A), además evaluaron si la actividad adyuvante de los NTVP6 dependía de la inoculación al mismo tiempo y en la misma posición, es decir si el efecto adyuvante era local o sistémico (Malm *et al.*, 2017). Los resultados mostraron que 1 μ g de NTVP6 no inducen un efecto adyuvante tan fuerte sobre la respuesta inmune humoral, como 10 μ g, y que no hay diferencias significativas entre los niveles inducidos por 10 μ g y 30 μ g (Figura 12A) (Malm *et al.*, 2017). Asimismo, se determinó que el efecto adyuvante depende de la inoculación de los NTVP6 con las VLPs de NoV en la misma posición y al mismo tiempo, con esto se refuerza que los NTVP6 actúan como vehículos de entrega y que el efecto adyuvante es local (Malm *et al.*, 2017). Además, se determinó que los NTVP6 inducen una respuesta balanceada del tipo celular Th1 y Th2, a diferencia de otros adyuvantes como sales de aluminio que tienen un sesgo promoviendo principalmente las respuestas celulares del tipo Th2. Este equilibrio se determinó mediante la detección de anticuerpos IgG1, un marcador de la respuesta del tipo Th2; e IgG2a, un marcador de la respuesta del tipo Th1 (Malm *et al.*, 2017).

Hasta aquí, los NTVP6 de todos los trabajos sobre su actividad adyuvante emplearon el sistema de expresión células de insecto-baculovirus (SCI-BV) para la producción de los mismos. En el último reporte de la actividad adyuvante de los NTVP6, se demostró que si son producidos en la planta *Nicotiana benthamiana* también son adyuvantes, y que son adyuvantes para una vacuna bivalente que contiene VLPs de NoV provenientes de proteínas VP1 de dos cepas distintas de NoV (Malm *et al.*, 2019).

2.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante la prueba de ELISA

Actualmente, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es el método más empleado para determinar el título de anticuerpos de una muestra determinada. Principalmente existen cuatro tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA “sandwich” y ELISA competitivo (Aydin *et al.*, 2015). El ELISA indirecto es uno de los tipos más empleados en la evaluación de los candidatos a vacuna contra el ZikV y la evaluación de la actividad adyuvante de los NTVP6, descritos en 2.2. y 2.4.1., respectivamente. Este tipo de ELISA es el empleado en el presente trabajo. De manera general, el ELISA indirecto consiste en los siguientes pasos: 1) sensibilizar un soporte con un antígeno, 2) colocar la muestra que potencialmente contiene anticuerpos que reconocen al antígeno, 3) colocar un anticuerpo secundario que reconoce a la clase o subclase específica que se desea detectar y que además esté conjugado a una enzima, 4) colocar el sustrato cromogénico de la enzima, y 5) obtener el valor de absorbancia de la reacción de ELISA (Aydin *et al.*, 2015). Este valor de absorbancia nos permite determinar la concentración del anticuerpo que se detectó en la muestra, a través de una curva estándar. En ausencia de una curva estándar se pueden realizar diluciones seriadas de la muestra y determinar un título de anticuerpos mediante distintos métodos de análisis de datos. Entre los métodos empleados se tiene al método de la curva sigmoide de cuatro parámetros. Este método se basa en graficar los valores de absorbancia de las diluciones evaluadas de una muestra versus el logaritmo de su dilución correspondiente, de tal manera que al unir los puntos se obtenga una gráfica sigmoide. A partir de dicha gráfica se pueden obtener los parámetros de la ecuación y así determinar el título de anticuerpos de una muestra. Este título se reporta como el recíproco de la dilución de la muestra al cual la respuesta fue el 50%, es decir el valor recíproco de dilución de la muestra que corresponde al punto medio de la parte lineal de la gráfica sigmoide. Este método ha sido recomendado como el más apropiado para análisis de datos de ELISA (Hartman *et al.*, 2018).

3. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

Los nanotubos de VP6 no muestran actividad adyuvante para la proteína E recombinante del ZikV cuando se inmunizan ratones.

Hipótesis alternativa

Los nanotubos de VP6 muestran actividad adyuvante para la proteína E recombinante del ZikV cuando se inmunizan ratones.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Conocer el efecto de los nanotubos de VP6 sobre la inmunogenicidad de la proteína E recombinante del ZikV.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta inmune humoral de un primer diseño experimental de ratones inoculados con la proteína E recombinante del ZikV formulada con y sin nanotubos de VP6 como adyuvante.
- Evaluar la respuesta inmune humoral de un segundo diseño experimental de ratones inoculados con la proteína E recombinante del ZikV formulada con y sin nanotubos de VP6 como adyuvante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Producción de nanotubos de VP6

Los NTVP6 se produjeron mediante el SCI-BV. La línea celular High Five® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) fue utilizada para la producción de los NTVP6. Las células de insecto High Five® se cultivaron en medio de cultivo PSFM® (PSC, Meriden, EUA). Se empleó el baculovirus recombinante bacVP6 (amablemente donado por la Dra. Susana López del IBt-UNAM). El bacVP6 es un baculovirus recombinante AcMNPV (nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica*) que contiene el gen que codifica para la proteína VP6 (cepa SA-11) bajo el promotor *polh* del baculovirus.

Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 1 L con un volumen de trabajo de 250 mL a una temperatura de 27 °C y 110 rpm. Los cultivos en crecimiento exponencial fueron infectados a una densidad de células viables de 1×10^6 cel/mL con el bacVP6 a una multiplicidad de infección (MDI) baja de 0.5 unidades formadoras de placa (UFP)/cel. Se trabajó con pases celulares 56, 61 y 63; y con un solo pase 2 del baculovirus recombinante bacVP6.

La concentración y la viabilidad celular se monitorearon cada 12 h con un equipo Coulter Counter (Coulter Electronics, Brea, EUA) y la técnica de exclusión de azul de tripano empleando una cámara de Neubauer, respectivamente. Los cultivos se cosecharon a las 96 horas post infección (hpi) cuando la viabilidad celular estuvo entre el 40-60% y la concentración de células viables alrededor de 0.9×10^6 cel/mL. Los cultivos se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C, y se colectó el sobrenadante clarificado.

5.2. Purificación de nanotubos de VP6

El sobrenadante clarificado obtenido del cultivo celular se empleó para la obtención de la proteína VP6 ensamblada en forma de nanotubos. La purificación se realizó mediante

la metodología descrita en Plascencia-Villa *et al.* (2011), la cual se basa en etapas continuas de ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular. Durante todo el proceso se mantuvo la cadena de frío a 4 °C aproximadamente. El sobrenadante clarificado se concentró en un equipo de ultrafiltración AMICON (Millipore, Billerica, EUA) empleando una membrana de celulosa regenerada de 30 kDa y aplicando una presión positiva (<55 psi).

Posteriormente, las etapas de cromatografía se realizaron en un sistema FPLC ÄKTAprime plus (GE Healthcare, Waukesha, EUA) acoplado a un sistema de adquisición de datos PrimeView (GE Healthcare), monitoreando absorbancia (280 nm), conductividad y el pH. El sobrenadante concentrado se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna XK-16 (GE Healthcare) empacada con aproximadamente 40 mL de resina Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Todo el proceso se realizó a un flujo de 2 mL/min. La columna fue equilibrada con al menos dos “volúmenes de columna” de la solución amortiguadora A (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 6.16) hasta que la conductividad y el pH estuvieran estables. Por cada ciclo se cargaron aproximadamente 25 mL de sobrenadante concentrado 2X. Se colectó el primer pico de la cromatografía, el cual contenía los componentes no adsorbidos. La elución de los componentes adsorbidos se realizó con la solución amortiguadora B (30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 6.16), logrando su elución en un segundo pico. Una vez que la absorbancia disminuyó hasta la línea base, se cambió a la solución amortiguadora A para equilibrar la columna y continuar con el siguiente ciclo de la cromatografía de intercambio aniónico.

La proteína VP6 producida en el SCI-BV se encuentra en condiciones de pH alrededor de 6.2-6.5 debido a las características de este cultivo celular (Palomares *et al.*, 2015). El punto isoeléctrico calculado de VP6 es 6.16 (Plascencia-Villa *et al.*, 2011). Por lo tanto, en la cromatografía de intercambio aniónico, las solución amortiguadora de equilibrio (A) y la solución amortiguadora de elución (B) se ajustaron a un pH de 6.16

para que la proteína VP6 no interaccione con la resina y salga en la fracción no unida (pico 1) de la cromatografía; mientras que en estas condiciones los ácidos nucleicos, los baculovirus y la proteína contaminante más abundante del SCI-BV, la proteína GP64 del baculovirus, están cargados negativamente y se unen a la resina. Luego, estos contaminantes se remueven de la resina mediante la solución amortiguadora de elución y se observan en el pico 2 de la cromatografía (Plascencia-Villa *et al.*, 2011). Entonces el pico 1 colectado de la cromatografía de intercambio aniónico contiene a la proteína VP6 ensamblada en nanotubos y no ensamblada (monómeros y trímeros), así como también otras proteínas del sistema SCI-BV (Castro, 2014).

El pico 1 se concentró de igual manera que el sobrenadante clarificado. El pico 1 concentrado se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna XK-26 (GE Healthcare) empacada con 400 mL aproximadamente de la resina Toyopearl HW65F (TOSOH Biosciences, San Francisco, EUA); la cual tiene partículas de 45 μm de tamaño, de 100 nm de tamaño de poro y permite separar moléculas de 40 kDa a 5000 kDa. Todo el proceso se realizó a un flujo de 1 mL/min. La columna fue equilibrada con al menos dos volúmenes de columna de solución amortiguadora (30 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). Por cada ciclo se cargaron aproximadamente 20 mL de muestra concentrada 8X. Se colectaron todos los picos de la cromatografía para su posterior evaluación.

En el proceso de cromatografía de exclusión molecular, los NTVP6 se obtienen en el volumen vacío de la columna (pico 1), ya que su tamaño es mayor que los poros de la resina, mientras que la proteína VP6 no ensamblada y otras proteínas contaminantes pequeñas entran en los poros y se retienen en la columna, y de esta manera se pueden purificar los NTVP6.

La muestra de NTVP6 purificados se concentró mediante ultrafiltración empleando tubos Corning Spin-X UF 6 con membranas de polietersulfona de 30 kDa (Corning®).

Finalmente, a la muestra concentrada se le agregó azida de sodio a una concentración final de 0.05% y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteína, la evaluación del proceso de purificación y la visualización de los NTVP6 se realizaron mediante los métodos detallados en 5.4., 5.5. y 5.6., respectivamente.

5.3. Intercambio de solución amortiguadora de los nanotubos de VP6

El proceso de cambio de solución amortiguadora de los NTVP6 se inició un día antes de su empleo para inmunizar ratones. El intercambio se realizó mediante diálisis de volúmenes pequeños. La muestra de NTVP6 se colocó en un microtubo de 1.5 mL, al cual se le cortó y retiró la parte central de la tapa, se colocó una sección de una membrana de diálisis de celulosa regenerada de 8-10 kDa (Spectrumlabs) en la boca del tubo, se bajó la tapa del tubo de tal manera que se fije la membrana y el tubo quede cerrado, el tubo se colocó en un flotador, y dentro de un vaso de precipitado con solución de diálisis PBS 1X (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄ y 135.9 mM NaCl) pH 7.4; de tal manera que la muestra a dializar quede en contacto con la membrana y que ésta quede en contacto con la solución de diálisis (Figura 13) . Se empleó un volumen de PBS equivalente a mil veces el volumen que se dializó. Se colocó un agitador magnético en el fondo del vaso de precipitado, y la diálisis se realizó en agitación durante toda la noche a 4 °C. Al finalizar la diálisis, se cuantificó la proteína y los NTVP6 se visualizaron mediante los métodos detallados en 5.4. y 5.6., respectivamente.

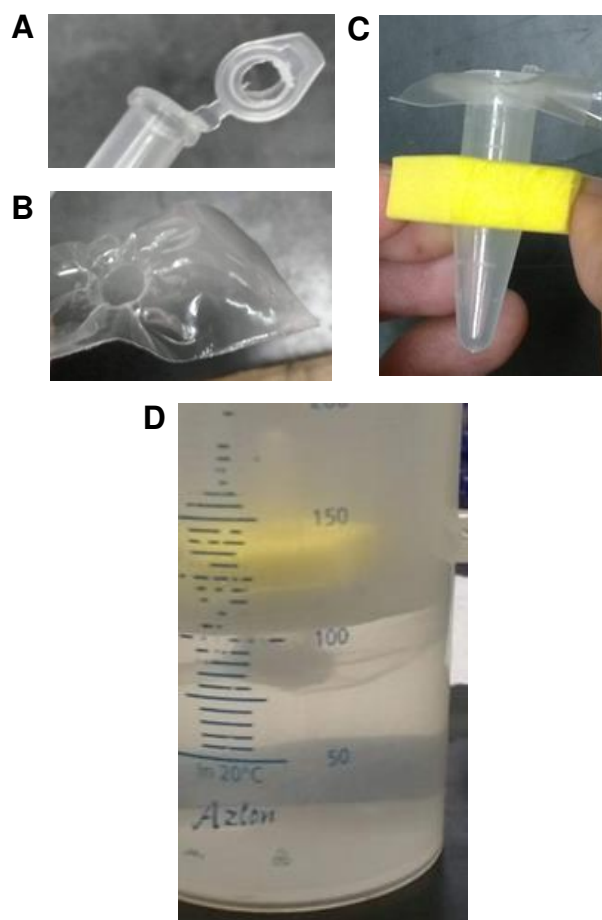


Figura 13. Diseño de diálisis. A) Microtubo de 1.5 mL con agujero en el centro de la tapa. B) Sección de una membrana de diálisis de celulosa regenerada de 8-10 kDa. C) Microtubo de 1.5 mL con membrana de diálisis, fijada por la tapa del microtubo, y flotador. D) Microtubo de 1.5 mL sumergido de manera invertida dentro del vaso de precipitado.

En la figura 14 se muestra el diagrama de flujo de la producción y purificación de los NTVP6 para el presente trabajo. El diagrama muestra desde el primer paso, la producción, hasta la verificación de la estructura de los NTVP6 luego de realizar la diálisis.

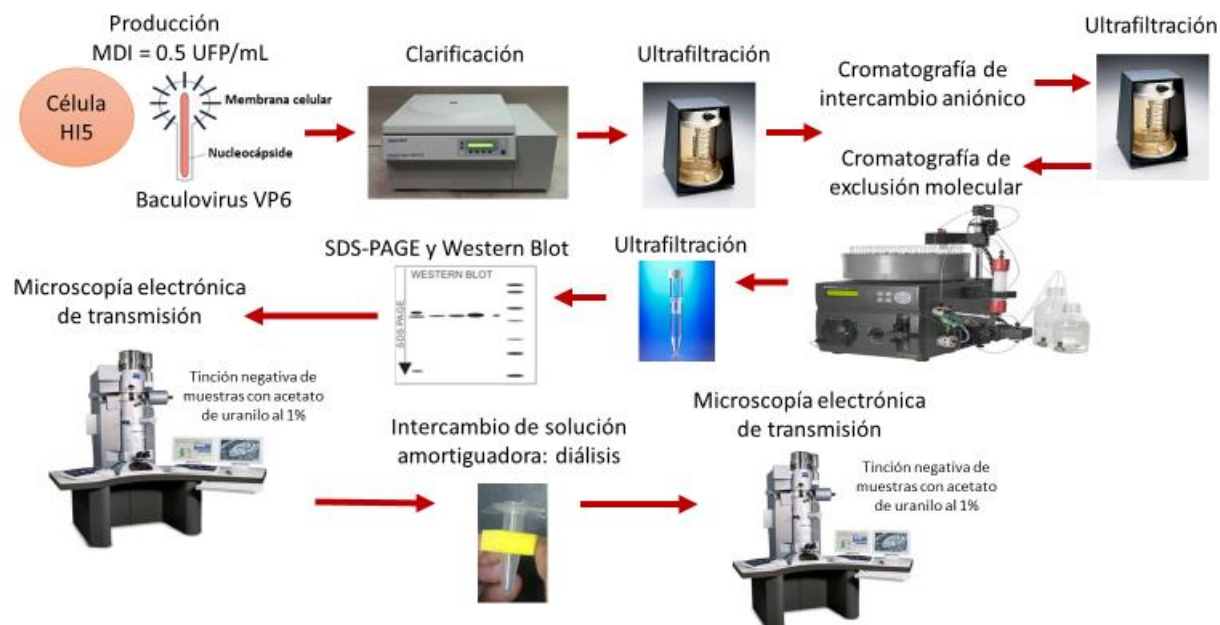


Figura 14. Diagrama de flujo del proceso de producción y purificación de los NTVP6.

5.4. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína total de todas las muestras se determinó mediante el método de Bradford en placa de 96 pozos (Nest Biotech Co., China). En cada pozo se colocaron 150 μ L de muestra diluida 1:10 o 1:50 en agua milli Q, y se le agregó 50 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino, en un rango de 5 a 80 μ g/mL. Cada estándar y muestra se analizaron por triplicado. Las muestras se incubaron 5 minutos protegidas de la luz y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, EUA).

5.5. SDS-PAGE y Western Blot

Para visualizar las proteínas presentes en una muestra y, en algunos casos, determinar la pureza de éstas, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato

sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie; y para comprobar la presencia de una determinada proteína se realizó la prueba Western Blot.

Se evaluaron muestras de sobrenadante de cultivo celular, purificadas y concentradas. La evaluación y comparación entre muestras se hizo por la misma cantidad de proteína total; en cada evaluación por SDS-PAGE y Western Blot se especifica la cantidad de muestra analizada, así como también los controles que se emplearon. Los marcadores de peso molecular empleados fueron Dual Color (Bio-Rad, Cat. 1610374) y BenchMark (ThermoFisher Scientific, Cat. 10747012).

En algunos casos se requirió concentrar la muestra, y para ello se empleó el sistema de concentración por centrifugación al vacío "Savant SpeedVac" (ThermoFisher Scientific, EUA).

Cada muestra se mezcló con solución amortiguadora de carga desnaturizante y reductora 4X (20% glicerol, 5% SDS, 100mM Tris-HCl pH 6.8, 1% β -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol), y la mezcla se incubó 10 minutos a 99 °C. Para la técnica SDS-PAGE, las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y reductoras utilizando solución amortiguadora de corrida Tris-glicina-SDS (24.8 mM tris base, 0.192 mM glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o se sometieron a electrotransferencia, en el caso del Western Blot.

La electrotransferencia se realizó hacia membranas de PVDF (Millipore) previamente activadas con metanol, en un sistema semiseco Owl® (ThermoFisher Scientific, EUA), utilizando solución amortiguadora de transferencia (38.63 mM glicina, 47.88 mM tris base, 0.037% SDS, 20% metanol) y aplicando un amperaje constante de 40 mA durante 1 h para cada gel. El bloqueo se realizó incubando la membrana de PDVF con leche descremada al 5% en solución amortiguadora TBS (72.31 mM NaCl, 7.61 mM Tris-HCl, pH 7.5) con Tween 20 al 0.1% (TBST), durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3

lavados con solución amortiguadora TBST por 10 minutos cada uno. Luego las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo primario durante 1 h a temperatura ambiente en agitación, se realizaron 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno. Posteriormente la membrana se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario. Se realizaron tres lavados y finalmente se hizo el revelado con luminol (Luminata™, Millipore). Las imágenes de los geles y membranas se capturaron con el fotodocumentador ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, EUA), y se visualizaron con el software Image Lab™ versión 6.0.1 (Bio-Rad). El software Image Lab™ también se empleó para determinar la pureza de las proteínas de interés. Como anticuerpo primario para detectar a la proteína VP6, se empleó suero policlonal de conejo anti-rotavirus cepa NCDV (producido en el bioterio del IBt-UNAM por la M.C. Ruth Pastor con la asesoría de la M.V.Z. Elizabeth Mata con rotavirus donados por la Dra. Susana López), diluido 1:4000 en TBST. Como anticuerpo primario para detectar a la proteína E, se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína E del ZikV (GeneTex, Cat. 133314) a una dilución 1:3000. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a una peroxidasa (Santa Cruz, Cat. SC-2004) y diluido 1:5000 en TBST.

5.6. Microscopía electrónica de transmisión

Los NTVP6 se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras por evaluar se montaron en rejillas de cobre de malla 200 cubiertas con formvar y carbón (Electron Microscopy Sciences, EUA). Se colocaron 10 µL de la muestra en la rejilla durante 2 minutos, el excedente se retiró con papel absorbente libre de pelusas y se agregaron 10 µL de acetato de uranilo al 1% para la tinción negativa de las muestras. El acetato de uranilo se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos antes de usarse. Luego de 2 minutos de tinción, se retiró el excedente con papel absorbente, y las rejillas se colocaron en un portamuestras, dejándolas secar al menos 30 minutos.

Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Zeiss LIBRA 120 (Zeiss, Alemania), operado a 80 kV.

5.7. Verificación de la pureza e identidad de la proteína E recombinante comercial del virus Zika

La proteína E del ZikV empleada en este trabajo es comercial (Aalto Bioreagents, Cat. AZ6312). La ficha de datos menciona que es una proteína producida en el sistema SCI-BV. Se encuentra en una solución amortiguadora PBS a un pH 7.4, presenta una pureza mayor al 85% (determinada por SDS-PAGE) y tiene un peso aproximado de 50 kDa. La verificación de la pureza e identidad de la proteína comercial se realizó mediante SDS-PAGE y Western Blot, respectivamente; como se detalla en 5.5.

5.8. Inmunización de ratones

El trabajo con ratones para el presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del IBt-UNAM bajo el proyecto N° 331 (Anexo 1). Los ratones se obtuvieron del Bioterio del IBt-UNAM y todo el trabajo con ellos se desarrolló dentro del área libre de patógenos del mismo. Para la identificación de cada ratón, se tatuaron las colas mediante el sistema de tatuado automatizado Labstamp® (Somark, EUA).

Ratones hembra BALB/c de entre 7 a 8 semanas de edad se inmunizaron con proteína E comercial del ZikV sola o en combinación con NTVP6 purificados en el presente trabajo. Antes de la inmunización, se verificó la identidad y pureza de la proteína E comercial mediante SDS-PAGE y Western Blot, y se obtuvo el suero preinmune de los ratones. La proteína E y los NTVP6 se mezclaron y diluyeron en PBS el mismo día de la inmunización. Los ratones fueron inmunizados vía intramuscular con jeringas de insulina y volúmenes de 50 µL por ratón.

Se trabajó bajo dos diseños experimentales. El primer diseño experimental estuvo formado por 4 grupos de ratones, y el segundo, por 3 grupos, con 5 individuos por grupo. Con respecto al primer diseño experimental, el primer grupo fue inmunizado con 10 µg de proteína E; el segundo, con 10 µg de proteína E y 5 µg de NTVP6; el tercer, con 10 µg de proteína E y 10 µg de NTVP6; y, el cuarto, con solo PBS. Con respecto al segundo diseño experimental, el primer grupo fue inmunizado con 0.5 µg de proteína E; el segundo, con 0.5 µg de proteína E y 10 µg de NTVP6; y, el tercer, con solo PBS. Todos los grupos fueron inoculados con dos dosis. El refuerzo (segunda dosis) se aplicó a los 16 días post inmunización. Los sueros inmunes se colectaron a los 116 días post inmunización.

Para la obtención de sueros preinmunes e inmunes, los ratones fueron inmovilizados mediante un cepo, con una hoja de bisturí se les realizó un corte de 1 mm aproximadamente en el extremo distal de la cola y se les frotó la cola estimulando el goteo de sangre dentro de microtubos de 1.5 mL hasta colectar entre 100-250 µL de sangre. La sangre colectada fue centrifugada a 10 000 rpm durante 2 minutos a 4 °C y se colectó entre 10-60 µL de suero que fue almacenado a -70 °C para ser evaluados posteriormente a través de la prueba de ELISA.

Los diseños experimentales de inmunización se muestran en las tablas 1 y 2, y la línea de tiempo del trabajo para ambos diseños experimentales se muestra en la figura 15.

Tabla 1. Primer diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.

Grupo	E (µg/ratón)	NTVP6 (µg/ratón)	Dosis
1	10	0	2
2	10	5	2
3	10	10	2
4 (Solo PBS)	-	-	2

Tabla 2. Segundo diseño experimental de inmunización de ratones BALB/c.

Grupo	E ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	NTVP6 ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Dosis
1	0.5	0	2
2	0.5	10	2
3 (Solo PBS)	-	-	2

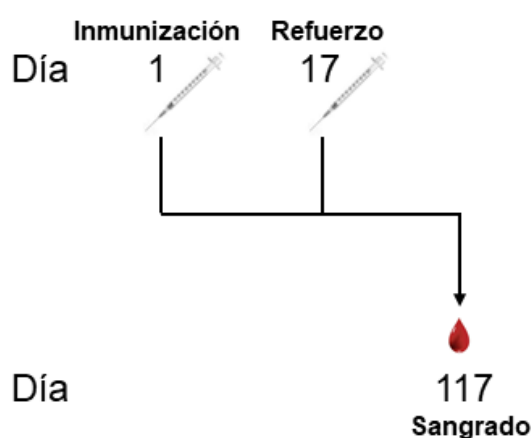


Figura 15. Línea de tiempo de la inmunización, refuerzo y el sangrado para la colecta de suero de los dos diseños experimentales.

5.9. Evaluación de la respuesta inmune humoral

La evaluación de la respuesta inmune humoral se realizó mediante la prueba de ELISA indirecto. Se evaluaron los sueros preinmunes y los sueros después de la inmunización.

Se realizó la prueba de ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG específicos de proteína E del ZikV en todos los sueros colectados, y para detectar anticuerpos IgG específicos de NTVP6 en los sueros de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental. Los sueros preinmunes se evaluaron para descartar la presencia de anticuerpos contra la proteína E o NTVP6 antes de la inmunización.

En el caso de la prueba de ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG específicos hacia la proteína E, se sensibilizaron placas Costar “high-binding” de 96 pozos

(Corning®) cubriendo con 100 µL/pozo de proteína E comercial a una concentración de 1 µg/mL en PBS o con 100 µL/pozo de PBS, e incubando toda la noche a 4 °C. Los pozos de las muestras, sueros controles y blanco se cubrieron con proteína E, y el control de bloqueo se cubrió solo con PBS. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBS 1X con Tween 20 al 0.1% (PBST) y se bloquearon con 300 µL/pozo de gelatina a una concentración de 5 g/L en PBST durante 2 h a 37 °C. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se añadieron 100 µL/pozo de los sueros problema y sueros controles diluidos en PBS, en los pozos correspondientes, según el diseño de la placa de trabajo, y al blanco y al control de bloqueo se les añadieron 100 µL/pozo de PBS; y la placa se incubó 1 h a 37 °C. Como suero control positivo, se empleó un suero de un ratón inmunizado con ZikV inactivado diluido 1:200. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se colocaron 100 µL/pozo del anticuerpo secundario diluido 1:1000 en PBS a todos los pozos, y se incubó 1 h a 37 °C. Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cat. 115-035-003). Los pozos se lavaron tres veces con 300 µL/pozo de PBST, se reveló colocando 100 µL/pozo del sustrato TMB (Invitrogen, Cat. 002023), y la placa se incubó durante 4 a 6 minutos protegida de la luz. Luego, la reacción se detuvo colocando 100 µL/pozo de HCl al 0.5 N.

Con respecto a la prueba de ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG específicos para los NTVP6, se sensibilizaron placas Costar “high-binding” de 96 pozos cubriendo con 100 µL/pozo de NTVP6 a una concentración de 5 µg/mL en solución amortiguadora de sensibilización (100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5) o con 100 µL/pozo de solución amortiguadora de sensibilización, e incubando toda la noche a 4 °C. Los pozos de las muestras, sueros controles y blanco se cubrieron con NTVP6, y el control de bloqueo se cubrió solo con solución amortiguadora de sensibilización. Los pozos se lavaron cinco veces con 200 µL/pozo de solución de lavado (50 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) y se bloquearon con 300 µL/pozo de solución de bloqueo (50

mM Tris pH 8.0, 5 g/L gelatina, 0.2% Tween 20) durante 2 h a 37 °C. Los pozos se lavaron cinco veces con 300 µL/pozo de solución de lavado y se añadió 100 µL/pozo de los sueros problema y sueros controles diluidos en solución de reacción (50 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1 g/L gelatina, 0.05% Tween 20), en los pozos correspondientes, según el diseño de la placa de trabajo, y al blanco y al control de bloqueo se les añadieron 100 µL/pozo de solución de reacción; y la placa se incubó 2 h a 37 °C. Como suero control positivo, se empleó el suero policlonal de conejo anti-rotavirus cepa NCDV diluido 1:200. Los pozos se lavaron cinco veces con 200 µL/pozo de solución de lavado, se colocaron 100 µL/pozo del anticuerpo secundario diluido 1:1000 en solución de reacción a todos los pozos, y se incubó 1 h a 37 °C. Se empleó el mismo anticuerpo secundario que se empleó para el ELISA para anticuerpos IgG específicos para la proteína E. Los pozos se lavaron cinco veces con 200 µL/pozo de solución de lavado, se reveló colocando 100 µL/pozo del sustrato TMB, y la placa se incubó durante 4 a 6 minutos protegida de la luz. Luego, la reacción se detuvo colocando 100 µL/pozo de HCl al 0.5 N.

Para determinar la presencia y el título de anticuerpos IgG específicos de la proteína E y de los NTVP6, las diluciones de los sueros problema fueron seriadas 1:2, iniciando en la dilución 1:100 en el primer pozo y 1:51200 en el último pozo para la proteína E, y 1:200 en el primer pozo y 1:51200 en el último pozo para los NTVP6. Cada dilución se analizó por duplicado. Luego de detener la reacción con el sustrato, la absorbancia de cada pozo se leyó a 450 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, EUA).

En las figuras 16 y 17 se observan los diseños de las placas de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpos para la proteína E y para los NTVP6, respectivamente.

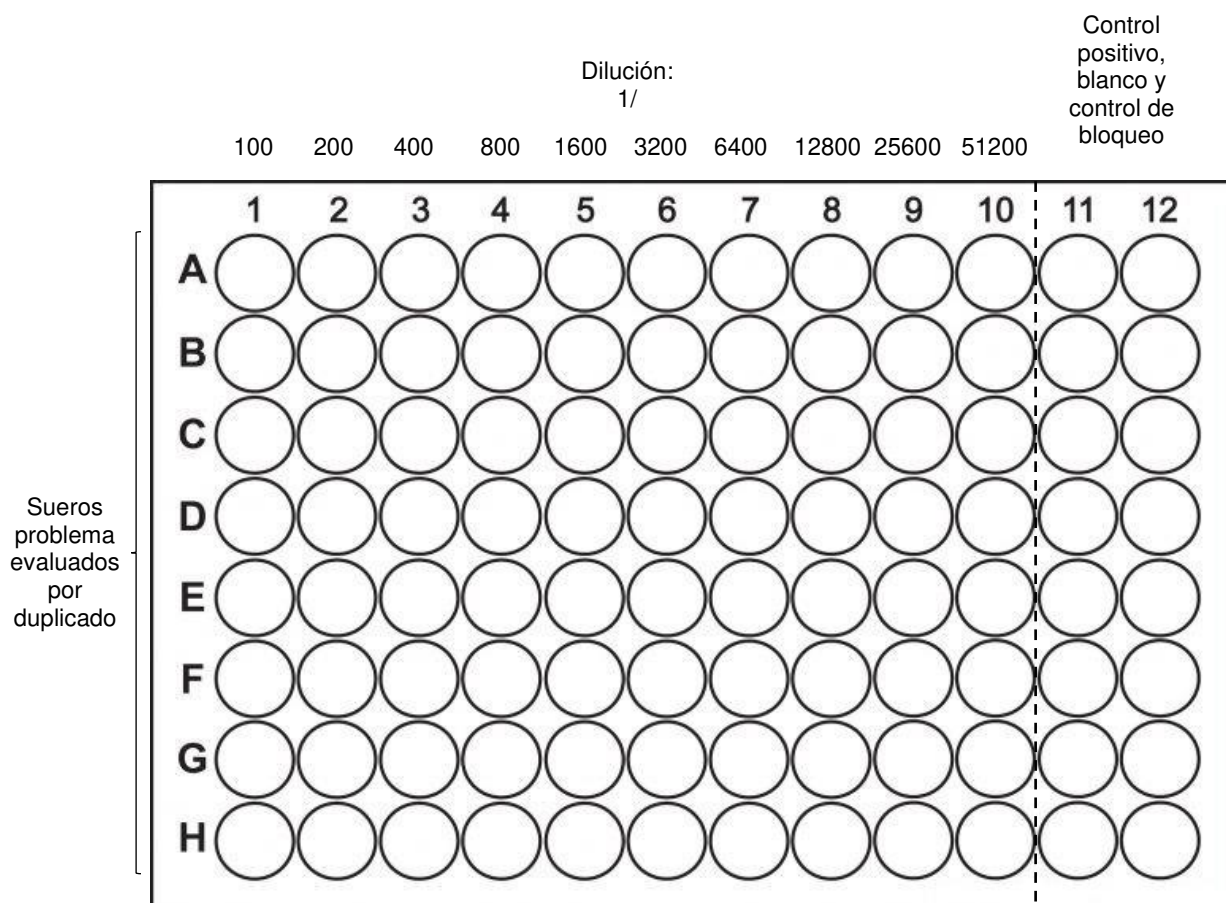


Figura 16. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG específicos hacia la proteína E.

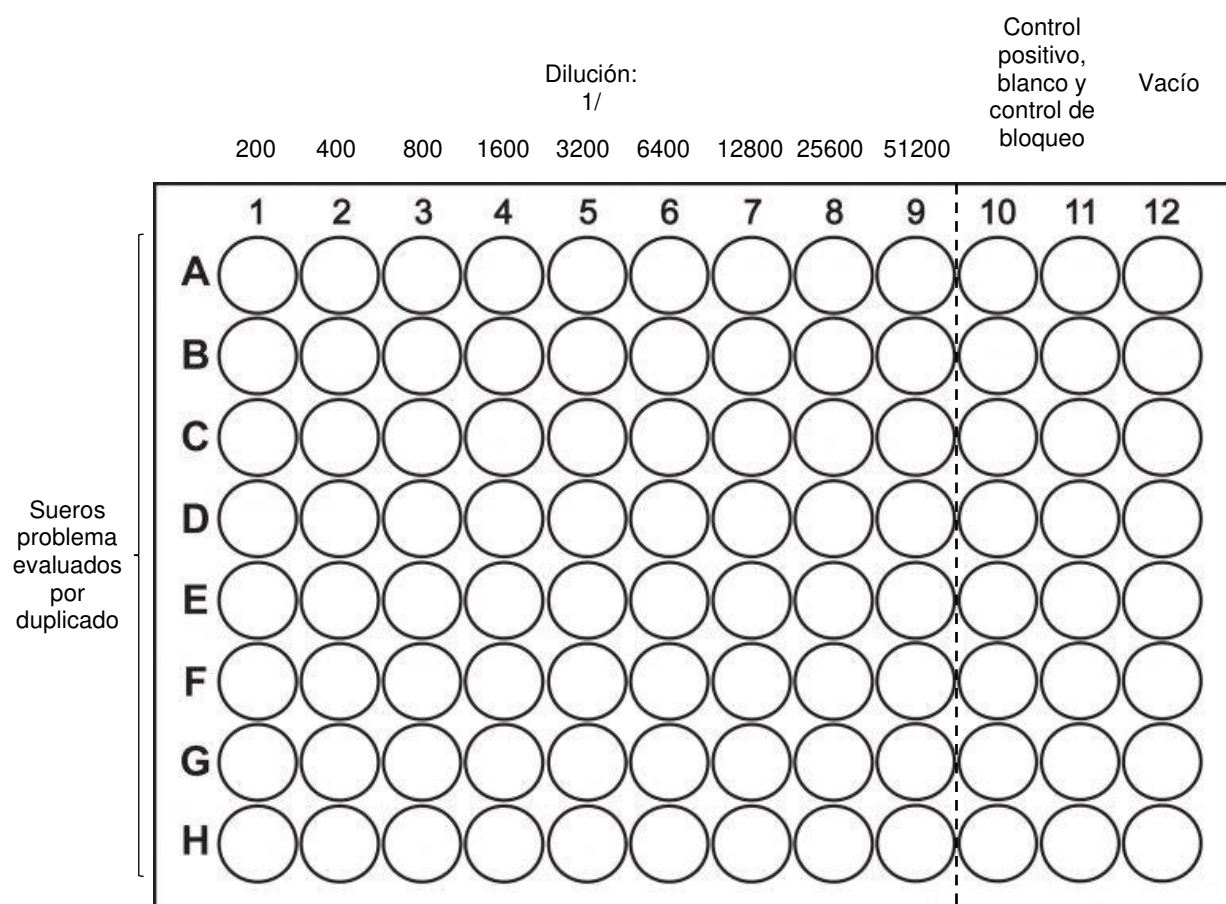


Figura 17. Diseño de trabajo en la placa de 96 pozos para la determinación de los títulos de anticuerpo IgG específicos hacia los NTVP6.

5.9.1. Procesamiento de datos y determinación del título de anticuerpos IgG

Para determinar los títulos de anticuerpos, se ajustaron los datos a un modelo de la curva sigmoide de cuatro parámetros. Para cada suero evaluado, se calculó el promedio de la absorbancia de los duplicados de cada dilución, y a cada promedio se les restó la media de la absorbancia de los pozos pertenecientes al blanco. Estos valores se graficaron versus el logaritmo en base 10 de su dilución correspondiente y se determinó la ecuación de la curva sigmoide de cuatro parámetros (Figura 18) mediante el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left[\frac{X}{X_0} \right]^b}$$

Figura 18. Ecuación de una curva sigmoide de cuatro parámetros. Y es la absorbancia; Y_0 , absorbancia mínima detectada; a, absorbancia máxima; X, logaritmo en base 10 de la dilución; X_0 , logaritmo en base 10 de la dilución a la cual se observa el 50% de la respuesta; y, b es un factor de la pendiente.

Al graficar los valores, se obtiene el factor de correlación (R^2). El coeficiente R^2 determina la calidad del modelo para replicar los resultados y el modelo será de mejor calidad mientras el coeficiente sea lo más cercano a 1.

Para calcular el título de anticuerpo de una muestra, se divide 1 entre el antilogaritmo del valor X_0 (línea roja en la Figura 19) de la ecuación de la curva sigmoide (Figura 18).

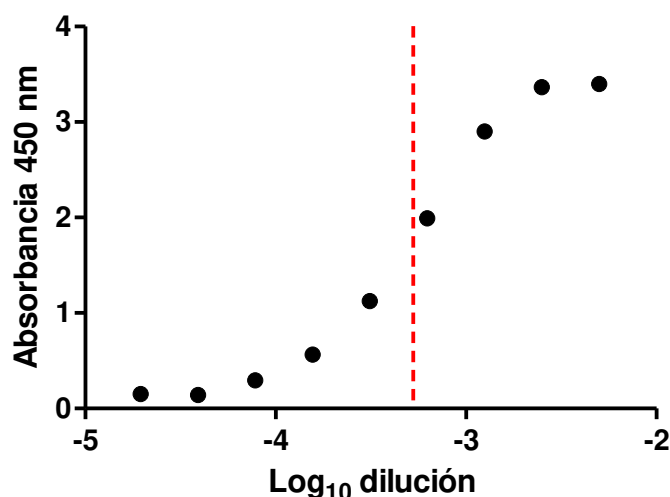


Figura 19. Gráfica representativa tipo sigmoide de la titulación de anticuerpos. La línea discontinua roja representa al valor X_0 , que es el logaritmo de la dilución a la cual se observa el 50% de la respuesta de reconocimiento del suero para un antígeno específico.

Para cada grupo, los datos de absorbancia de cada dilución son presentados como la media aritmética (promedio) y la desviación estándar (DE); mientras que los títulos de anticuerpos son presentados como la media geométrica y el intervalo de confianza del 95% para la media geométrica (IC 95%). Se evaluó si los títulos de anticuerpos de cada grupo siguen una distribución normal mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Las comparaciones de títulos de anticuerpo entre dos grupos independientes se realizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Estos análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores p (p-valor) fueron menores a 0.05 y se indican con un *.

6. RESULTADOS

6.1. Producción y purificación de nanotubos de VP6

Los procesos de producción y purificación se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados similares en cada proceso.

En la figura 20 se observa un cromatograma típico obtenido en el presente trabajo, el cual es típico del diseño de cromatografía de intercambio aniónico para remover ácidos nucleicos y a la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus en el proceso de purificación de NTVP6 (Plascencia-Villa *et al.*, 2011).

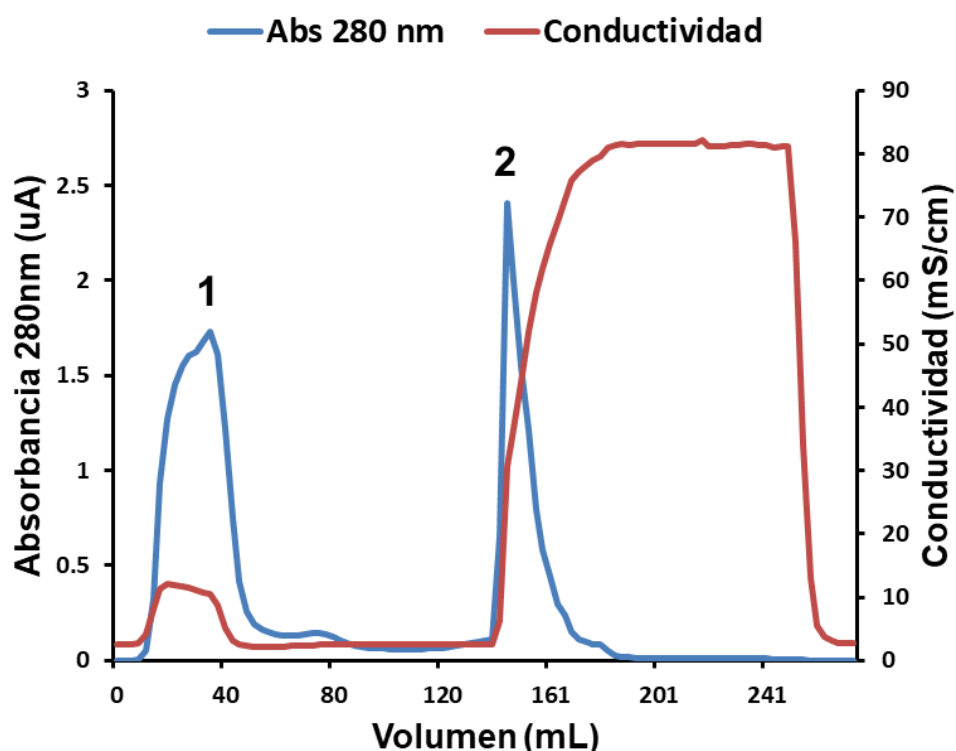


Figura 20. Cromatografía de intercambio aniónico. El pico 1 de la línea azul pertenece a los componentes no adsorbidos de la muestra, y el pico 2, componentes adsorbidos, se obtiene al inyectar una solución amortiguadora que tiene mayor fuerza iónica (1 M de NaCl), el cual se relaciona con el aumento en la conductividad (línea roja).

En la figura 21 se observa un cromatograma de exclusión molecular obtenido en el presente trabajo, el cual es el esperado para separar NTVP6 de VP6 no ensamblada y de otras proteínas pequeñas (Plascencia-Villa *et al.*, 2011).

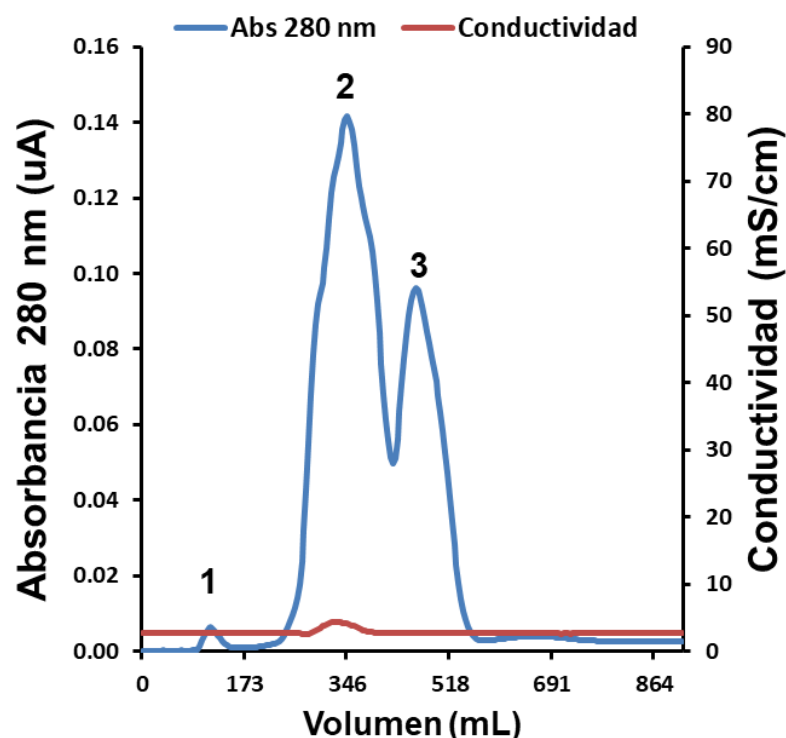


Figura 21. Cromatografía de exclusión molecular. El pico 1 de la línea azul pertenece a los NTVP6; el pico 2, a VP6 no ensamblada y otras proteínas contaminantes; y, el pico 3, a otras proteínas contaminantes de menor peso molecular.

Se midieron las concentraciones de proteína del sobrenadante clarificado del cultivo celular infectado, el sobrenadante concentrado (retenido), el sobrenadante filtrado (permeado), los picos 1 y 2 de la cromatografía de intercambio aniónico, el pico 1 concentrado y pico 1 filtrado de la cromatografía de intercambio aniónico, los picos 1, 2 y 3 de la cromatografía de exclusión molecular, el pico 1 concentrado y filtrado de la cromatografía de exclusión molecular, y el pico 1 concentrado después de dializar. Se calculó el rendimiento del proceso de producción/purificación, luego de la cromatografía de exclusión molecular, el cual fue de 2.28 mg de NTVP6/L de cultivo.

El proceso de purificación de NTVP6 se evaluó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 22), y la identidad de la proteína VP6 en la muestra de NTVP6 purificados se verificó mediante Western Blot (Figura 23). En la figura 22, se observa la presencia de la proteína VP6 (45 kDa) purificada en el carril 7 del gel desnaturizante

reductor, el cual corresponde al pico 1 de la cromatografía de exclusión molecular. En los otros carriles, se puede observar la presencia de otras bandas de proteínas de mayor y menor peso molecular que la proteína VP6, que en su mayoría desaparecen en el carril 7. De acuerdo con el análisis densitométrico del carril 7, la pureza obtenida de VP6 es mayor al 95%, lo cual concuerda con el resultado de Plascencia-Villa *et al.* (2011).

En el carril 4 de la figura 23, los resultados de Western Blot en condiciones reductoras y desnaturalizantes muestran la banda de 45 kDa, la cual corresponde al monómero de la proteína VP6 de RV. No se observa proteína VP6 degradada.

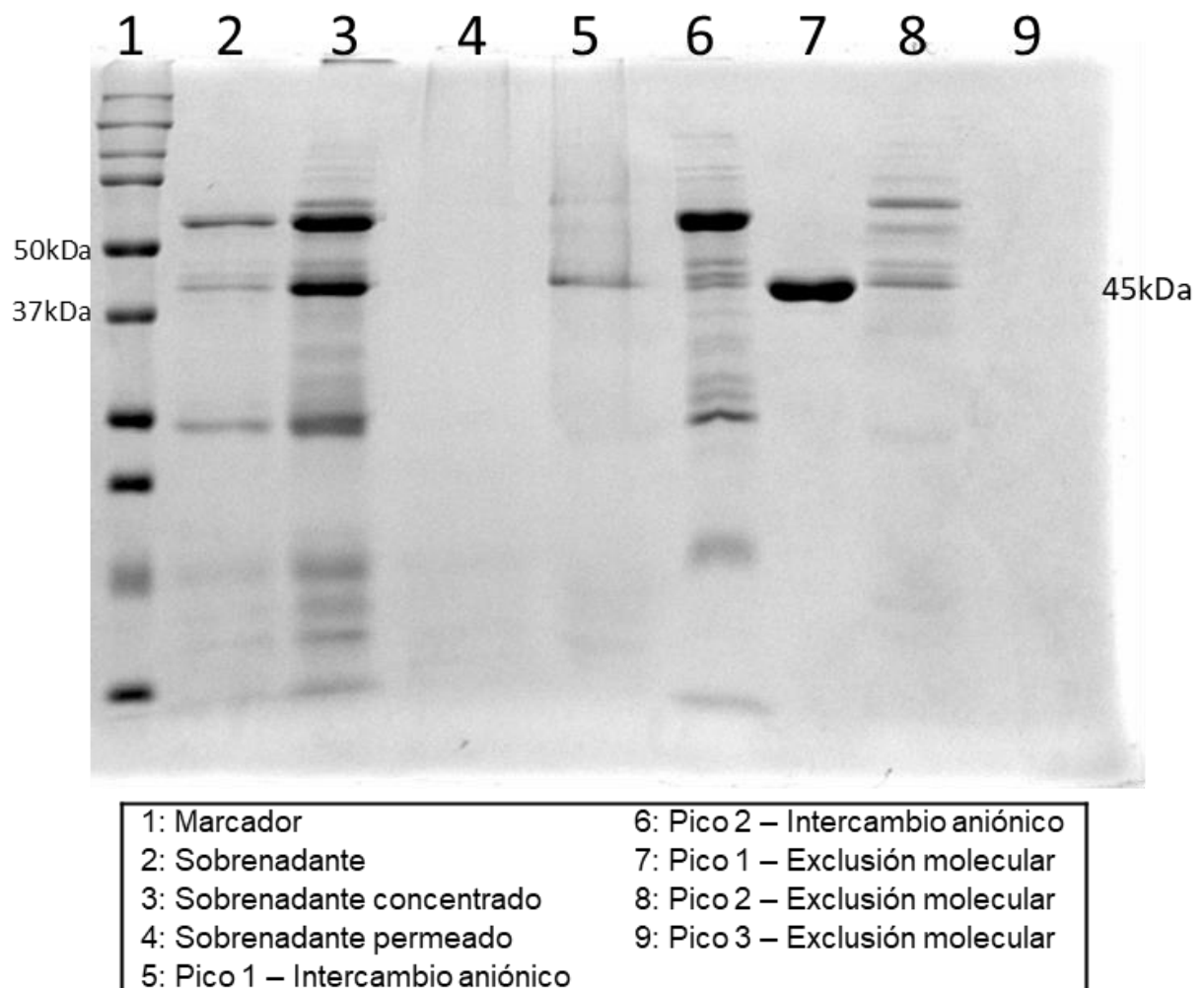


Figura 22. Evaluación del proceso de purificación de los NTVP6 por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Marcador: Dual Color. Del carril 2 al 9 se cargaron 10 µg de proteína total.

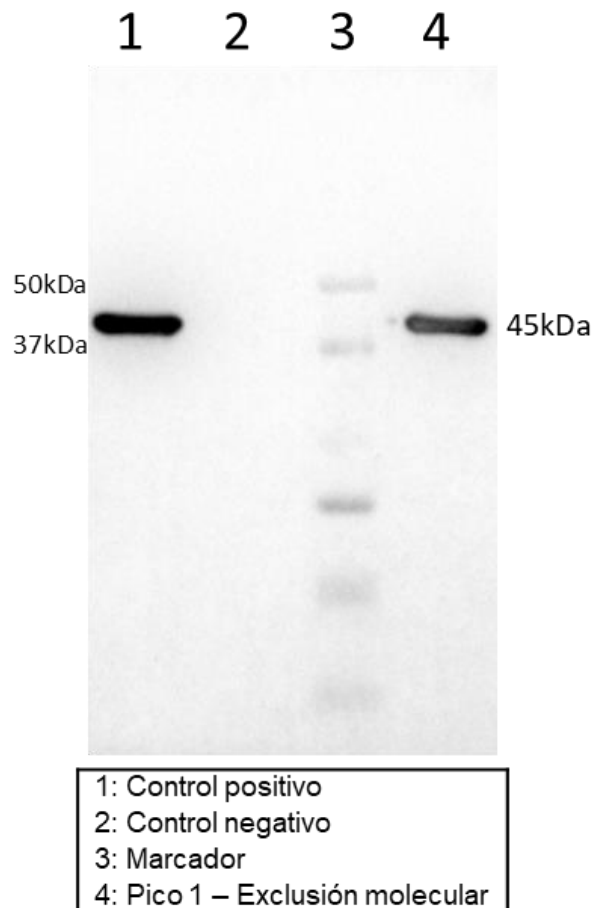


Figura 23. Western Blot con suero policlonal anti-rotavirus. Se reveló con luminol. Control positivo: NTVP6 purificados por la Dra. Mabel Rodríguez (IBt-UNAM). Control negativo: proteínas de la cápside del virus adenoasociado-8 producidas en el SCI-BV durante el proyecto de maestría de Arturo Liñan (IBt-UNAM). Marcador: Dual Color. En los carriles 1,2 y 4 se cargaron 5 µg de proteína total.

La visualización de los NTVP6 se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión, y en la figura 24 se muestran micrografías obtenidas en el presente trabajo, a diferentes aumentos. La estructura de los NTVP6 purificados se confirmó por microscopía electrónica de transmisión, los cuales tuvieron entre 1.5 µm – 6 µm de longitud y presentaron el patrón hexagonal característico de los NTVP6. En la figura 24A se señala la longitud de un NTVP6, la cual fue de aproximadamente 5.16 µm; y en la figura 24E se señala el ancho de un NTVP6, el cual fue de aproximadamente 76.86 µm (NTVP6 anchos).

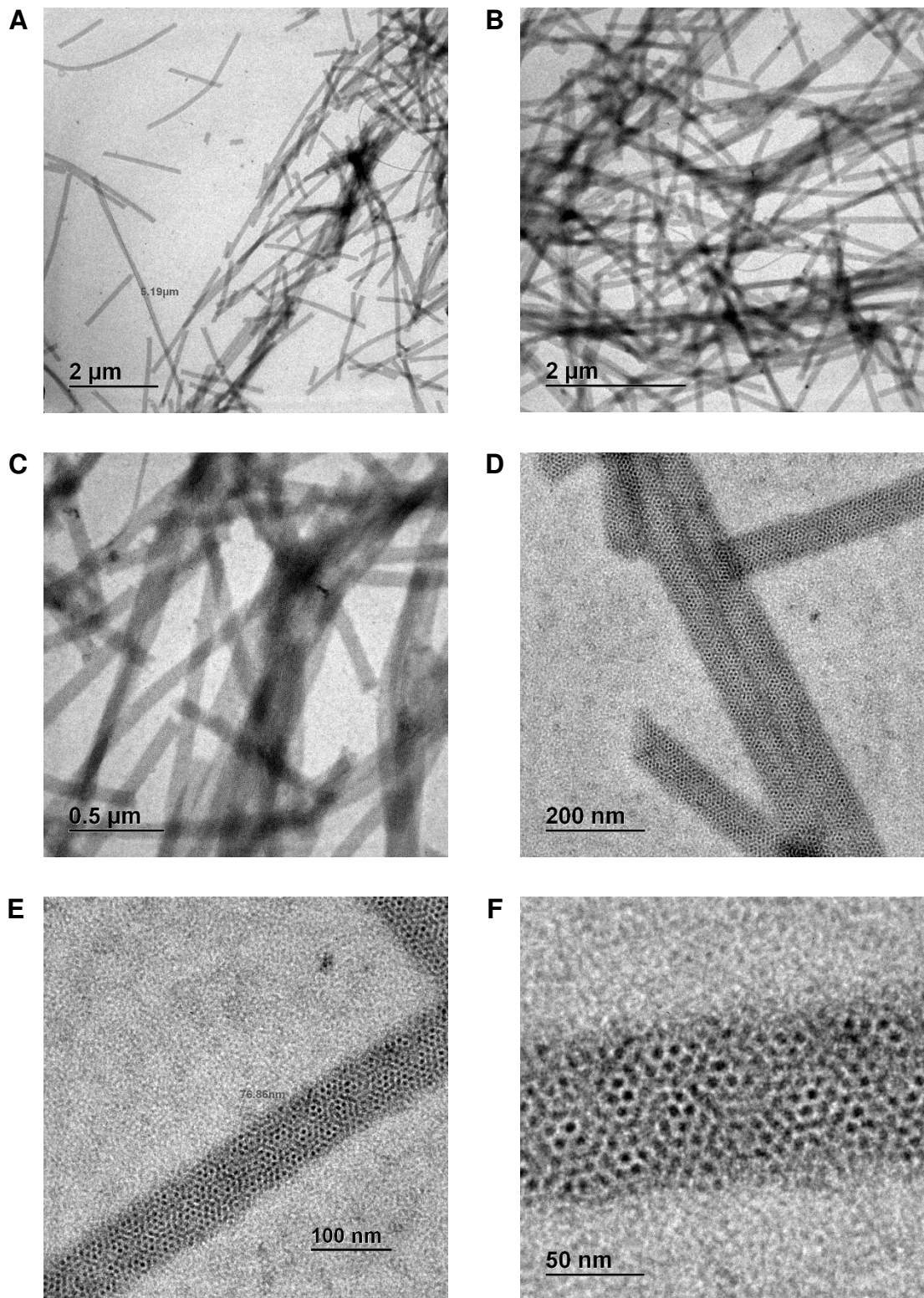


Figura 24. Micrografías de NTPV6 purificados obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. A) NTPV6 a 2500X. B) NTPV6 a 4000X. C) NTPV6 a 10000X. D) NTPV6 a 25000X. E) NTPV6 a 40000X. F) NTPV6 a 100000X.

Los NTVP6 purificados, concentrados, y dializados contra PBS se observan en micrografías en la figura 25. La proteína total también se cuantificó después de la diálisis para verificar que no se hayan perdido NTVP6 durante este paso.

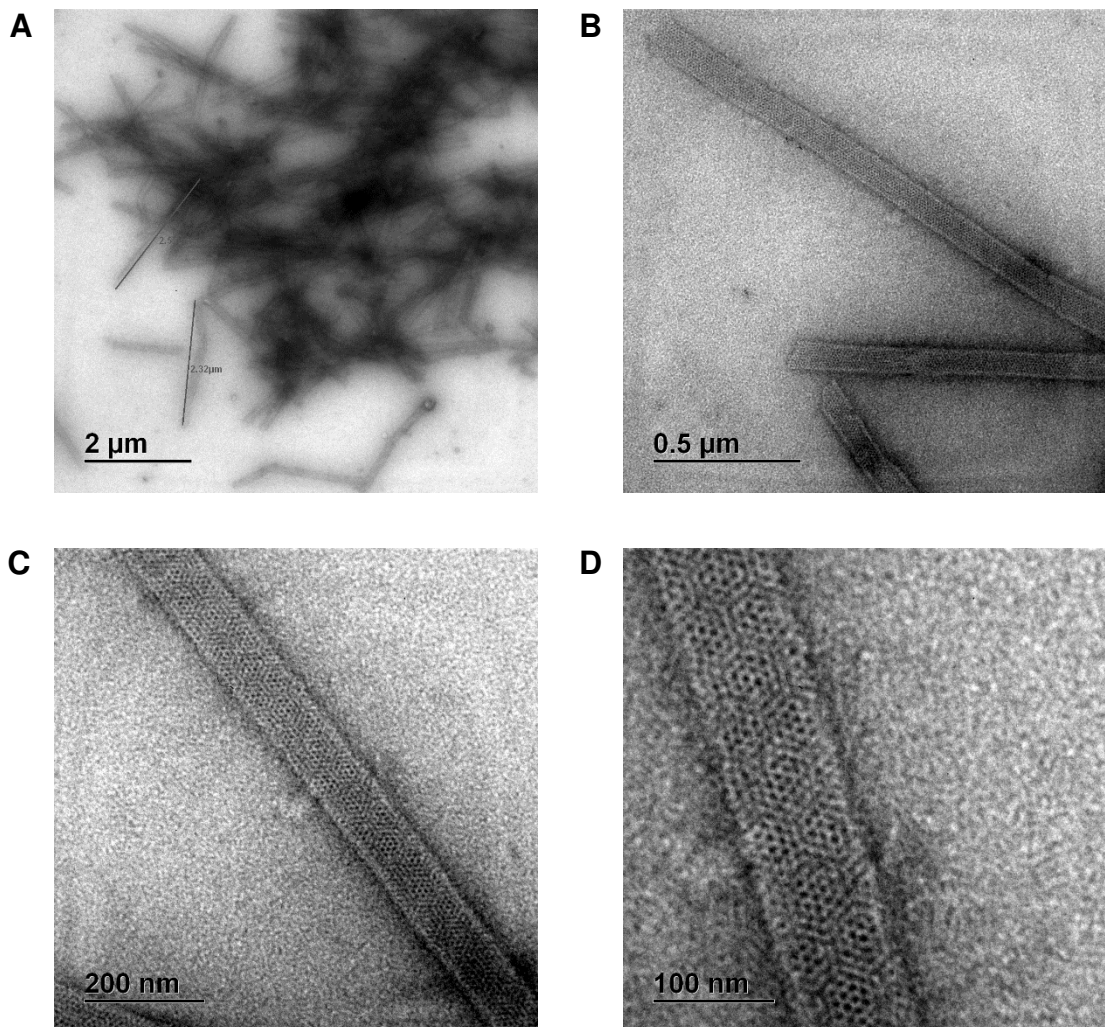


Figura 25. Micrografías de NTVP6 purificados e intercambiados de solución amortiguadora a PBS. A) NTVP6 a 2520X. B) NTVP6 a 1250X. C) NTVP6 a 25000X. D) NTVP6 a 50000X.

No se perdió proteína durante el proceso de diálisis, y la estructura de los NTVP6, vista mediante microscopía electrónica de transmisión, se mantiene (Figura 25). Los bordes de los NTVP6 se observan más oscuros que los NTVP6 en solución amortiguadora Tris-HCl, y la longitud de estos, en promedio, es menor que los NTVP6 en Tris-HCl. En la figura 25A se señala la longitud de un NTVP6 alrededor de 2 µm.

6.2. Verificación de la pureza e identidad de la proteína E recombinante comercial del virus Zika

Los resultados sobre la pureza e identidad se muestran en las figuras 26 y 27, respectivamente.

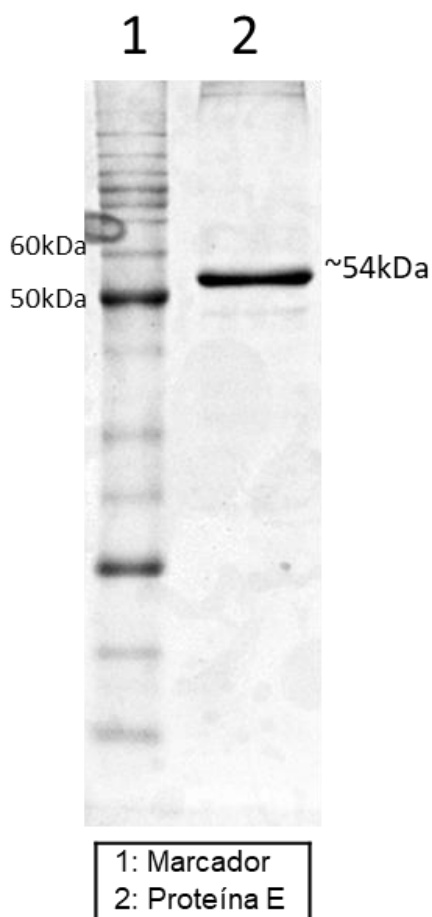


Figura 26. Evaluación de la pureza de la proteína E comercial por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Marcador: BenchMark. En el carril 2 se cargó 5 µg de proteína total.

En la figura 26 se observa una banda intensa de aproximadamente 54 kDa y otras bandas más tenues de diferentes tamaños. La pureza de la banda más intensa, efectivamente, es mayor al 85%. Esta información correlaciona con la información de la proteína E en la ficha de datos de la empresa Aalto Bioreagents. El carril 3 de la figura 27 muestra 3 bandas correspondientes a la proteína E del ZikV, la banda más intensa se corresponde con la banda más intensa observada en la evaluación por SDS-PAGE de la figura 26 (carril 2); al igual que las otras 2 bandas tenues se observan en ambas

figuras (26 y 27), estas últimas corresponderían a proteína E degradada. Por lo tanto, se verificó la identidad de la proteína E comercial del ZikV.

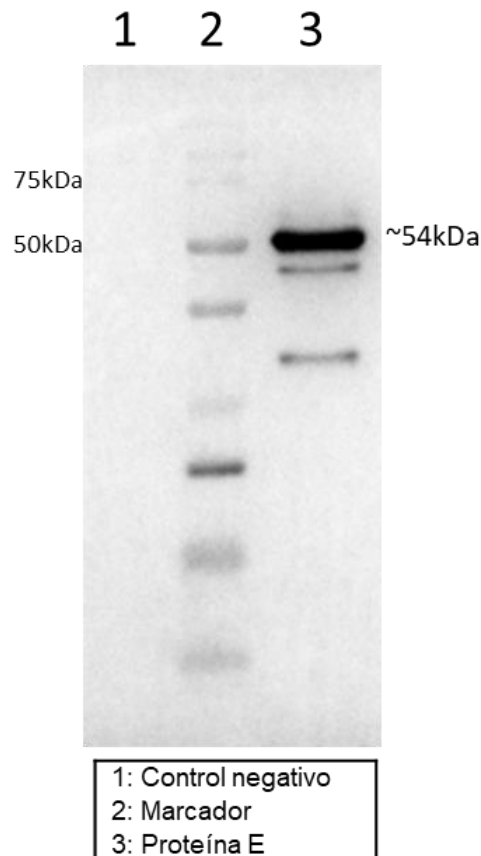


Figura 27. Western Blot con el anticuerpo policlonal anti-proteína E del ZikV. Se reveló con luminol. Control negativo: proteínas de la cápside del virus adenoasociado-8 producidas en el SCI-BV durante el proyecto de maestría de Arturo Liñan (IBt-UNAM). Marcador: Dual Color. En los carriles 1 y 3 se cargaron 5 µg de proteína total.

6.3. Inmunización de ratones y evaluación de la respuesta inmune humoral

Todas las curvas sigmoides correspondientes a los sueros inmunes tuvieron un valor de R^2 mayor o igual a 0.99, mientras que los valores de R^2 para los sueros preinmunes tuvieron valores entre 0.8 y 0.99. Los ratones, a través de la evaluación de sus sueros preinmunes, no mostraron presencia de anticuerpos específicos para la proteína E o los

NTVP6 antes de la inmunización. Si es que presentaron un título, este fue muy bajo y parecido a los valores observados en los sueros inmunes del grupo control (Anexos 2 y 3).

Para comparar los valores de título de anticuerpos IgG entre grupos, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, debido a que no todos los grupos presentaron distribución normal para aplicar una prueba paramétrica como la prueba t de Student (McKnight y Najab, 2010).

6.3.1. Primer diseño experimental

Con respecto a los sueros inmunes evaluados para la detección de anticuerpos IgG específicos de la proteína E, la gráfica de los valores de absorbancia versus sus respectivas diluciones se muestra en la figura 28. En el grupo control (solo PBS) se observa señal, aunque ésta es muy baja; y al comparar los grupos inmunizados con el grupo control, se observa claramente mayor señal en los grupos inmunizados. El grupo que fue inmunizado con proteína E sola presentó una mayor señal para anticuerpos específicos de la proteína E, en comparación a los grupos que fueron coadministrados con proteína E y NTVP6. Los títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E para cada grupo se muestran en la tabla 3.

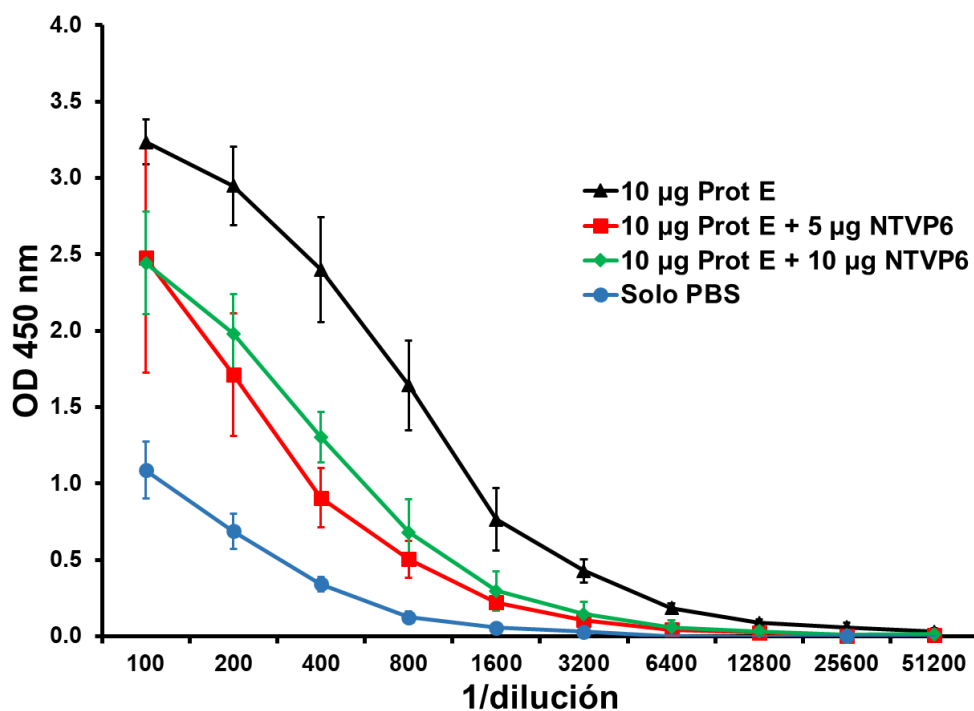


Figura 28. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones del primer diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de la proteína E (Prot E). Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n=5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia de sus respectivas diluciones.

Tabla 3. Títulos de anticuerpos IgG específicos a la proteína E del primer diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno	Media geométrica	IC 95%
1	10 µg Prot E	700.40	[459-1069]
2	10 µg Prot E + 5 µg NTVP6	181.30	[146-225.1]
3	10 µg Prot E + 10 µg NTVP6	351.43	[305.1-404.8]
4	Solo PBS	164.60	[135.1-200.5]

Comparando la media geométrica de los títulos de cada grupo, se observa que el grupo 1 (10 µg Prot E) tiene mayor título (700.40), luego le sigue el grupo 3 (10 µg Prot E + 10 µg NTVP6), y finalmente, el grupo 2 (10 µg Prot E + 5 µg NTVP6) y el grupo 4 (solo PBS) tienen casi el mismo valor de título. El grupo 1 tuvo un título 3.86 veces mayor que el grupo 2, y 1.99 veces mayor que el grupo 3; mientras que el grupo 3 tuvo un título 1.94 veces mayor que el grupo 2. La comparación entre los títulos de anticuerpo IgG específicos para la proteína E se muestra a través del gráfico de títulos para cada individuo de cada grupo (Figura 29).

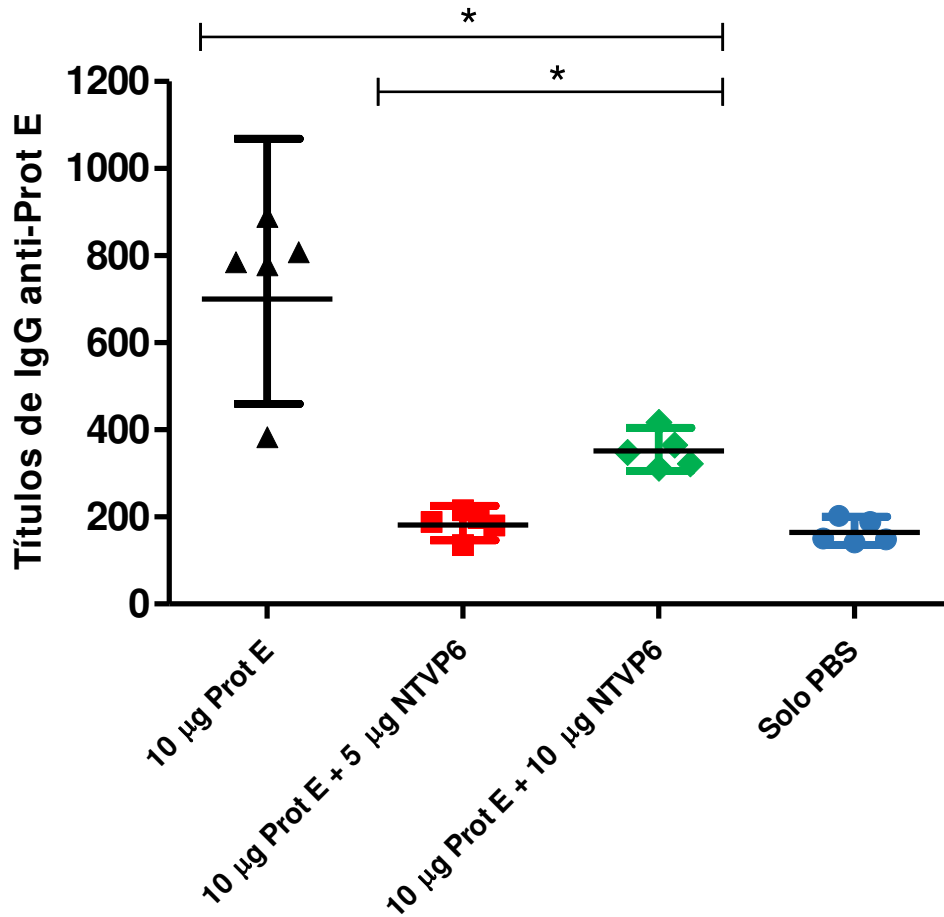


Figura 29. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del primer diseño experimental. Los títulos calculados mediante el método de la curva sigmoide de cuatro parámetros se muestran por individuo y con la media geométrica para cada grupo (n=5). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$) entre grupos se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

En la figura 29, se puede observar que el grupo 1 tiene título alrededor de 814, sin embargo, uno de sus individuos muestra un título muy bajo (383.8) con respecto a los otros, por lo cual su media resulta 728.92 y las barras de error incrementan su longitud. El grupo 2 presenta como títulos más bajo y alto a los valores 135.93 y 215.72, respectivamente. El grupo 3 tiene como valores extremos a 312.54 y 417.16. Por último, el grupo control presenta títulos (entre 141.68 a 202.21) muy parecidos al grupo 2, y no hay diferencias significativas entre estos 2 grupos (p-valor = 0.6905), lo que muestra que el grupo 2 no produjo anticuerpos contra la proteína E.

Se observó que la inmunización con solo 10 µg de proteína E (grupo 1) indujo una mayor producción de anticuerpos IgG específicos hacia la proteína E que los grupos que recibieron 10 µg de proteína E + 5 µg de NTVP6 (grupo 2) y 10 µg de proteína E + 10 µg de NTVP6. Las diferencias son estadísticamente significativas (p-valor = 0.0079 entre los grupos 1 y 2; y, p-valor = 0.0159 entre los grupos 1 y 3). Estos resultados indican que los NTVP6 no actuaron como adyuvante de la respuesta inmune humoral para la proteína E; por el contrario, parecería que interfieren con ella. Sin embargo, cuando se incrementó la dosis de NTVP6 administrados de 5 µg a 10 µg, se observó un incremento en la respuesta inmune humoral específica para la proteína E, la cual es estadísticamente significativa (p-valor = 0.0079 entre los grupos 2 y 3).

Para verificar que el grupo 3 haya recibido una mayor cantidad de NTVP6 (10 µg) que el grupo 2 (5 µg), se evaluó la respuesta inmune humoral específica hacia los NTVP6 en ambos grupos.

La gráfica de los valores de absorbancia para anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 versus sus respectivas diluciones se muestra en la figura 30. El grupo que fue inmunizado con 10 µg de NTVP6 (grupo 3) presentó una mayor señal para anticuerpos específicos de los NTVP6, en comparación con el grupo al que se le administró 5 µg de NTVP6 (grupo 2). Los títulos de anticuerpos IgG específicos a NTVP6 para cada grupo se muestran en la tabla 4.

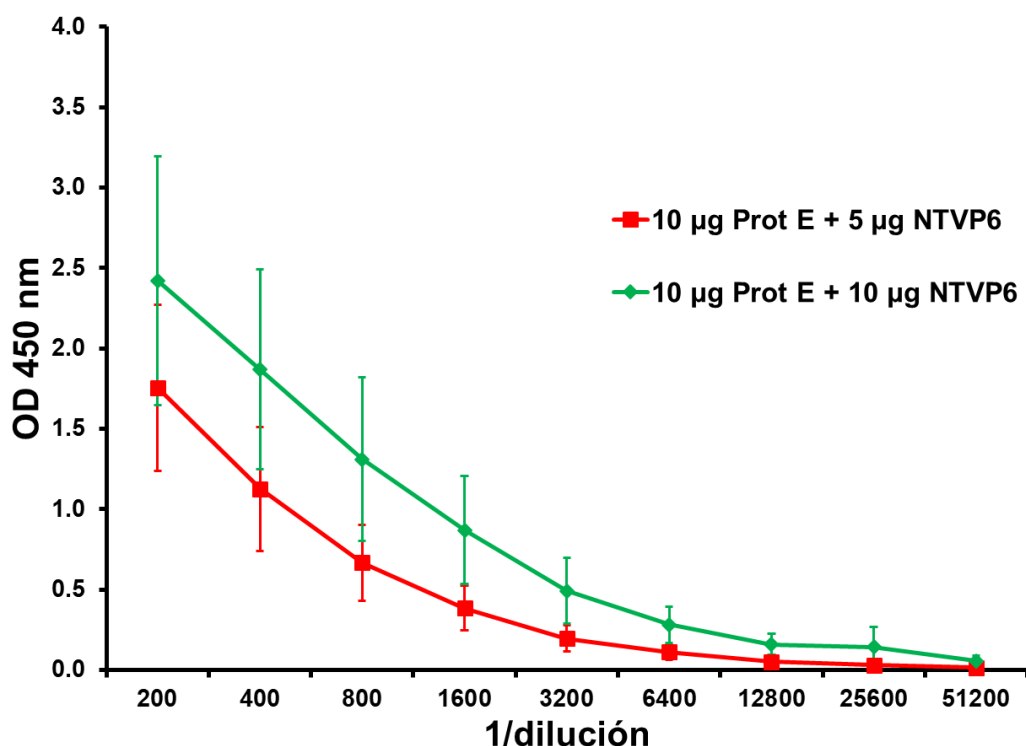


Figura 30. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n=5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia de sus respectivas diluciones.

Tabla 4. Títulos de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno	Media geométrica	IC 95%
2	10 µg Prot E + 5 µg NTVP6	86.05	[30.30-244.4]
3	10 µg Prot E + 10 µg NTVP6	453.3	[292.2-703]

Comparando la media geométrica de los títulos ambos grupos, se observa que el grupo 3 (10 µg Prot E + 10 µg NTVP6) tiene mayor título (453.3) que el grupo 2 (10 µg Prot E + 5 µg NTVP6). La comparación entre los títulos de anticuerpo IgG específicos para los NTVP6 se muestra a través del gráfico de títulos para cada individuo de ambos grupos (Figura 31). El grupo 3 tuvo un título 5.27 veces mayor que el grupo 2.

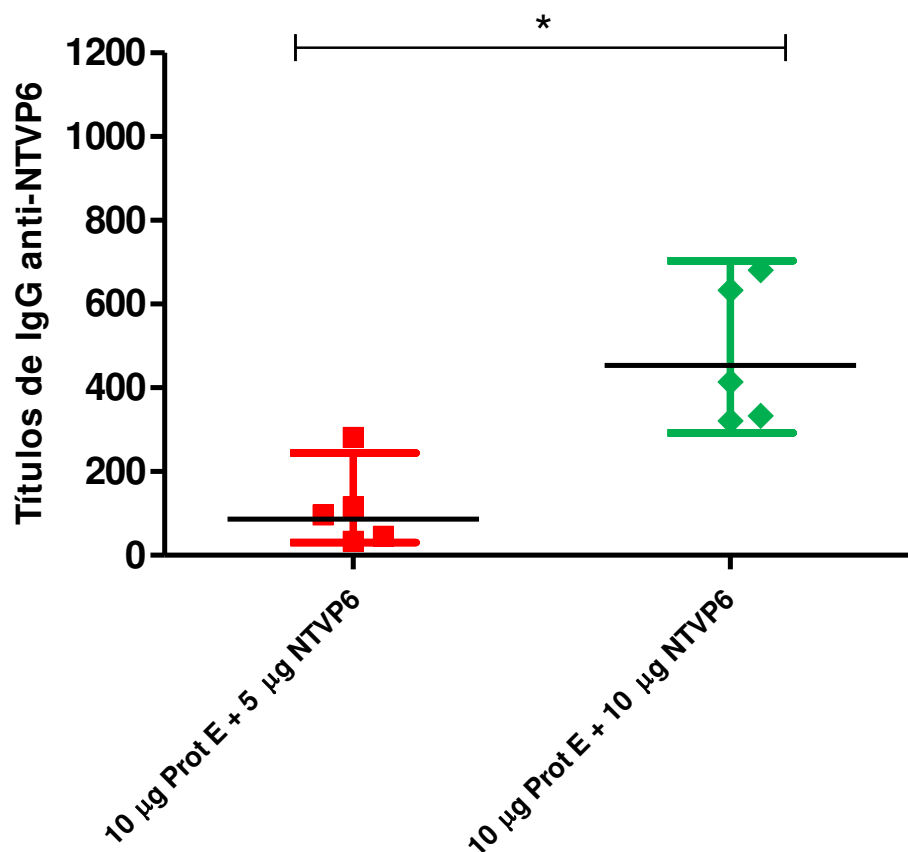


Figura 31. Títulos de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental. Los títulos calculados mediante el método de la curva sigmoide de cuatro parámetros se muestran por individuo y con la media geométrica para cada grupo (n=5). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$) entre grupos se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

El grupo 2 presenta como títulos más bajo y alto a los valores 33.22 y 281.90, respectivamente. El grupo 3 tiene como valores extremos a 321.22 y 681.87.

En la figura 31 se puede observar que el grupo 3 tiene valores mayores de títulos de anticuerpos IgG específicos de NTVP6, en comparación con el grupo 2; y este resultado es avalado por las diferencias estadísticamente significativas (p-valor = 0.0079). Por lo

tanto, se confirma que no hubo error en la asignación de los grupos 2 y 3. Los resultados observados en los títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E en los grupos 2 y 3 se deben al empleo de 5 µg y 10 µg de NTVP6, respectivamente.

6.3.2. Segundo diseño experimental

El segundo diseño experimental se llevó a cabo debido a que en el primer diseño experimental no se obtuvo actividad adyuvante de los NTVP6 sobre la inmunogenicidad de la proteína E, al comparar los títulos de anticuerpos del grupo que recibió proteína E sola contra los grupos que fueron coadministrados con proteína E y NTVP6. A diferencia del primer diseño experimental, en el segundo se empleó una dosis 20 veces menor de proteína E.

La gráfica de los valores de absorbancia para anticuerpos IgG específicos de la proteína E versus sus respectivas diluciones se muestra en la figura 32. Se observa mayor señal de absorbancia en el grupo al que se le coadministró proteína E y NTVP6, luego en el grupo que recibió proteína E sola, y finalmente, la señal más baja en el grupo control. Los títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E para cada grupo se muestran en la tabla 5.

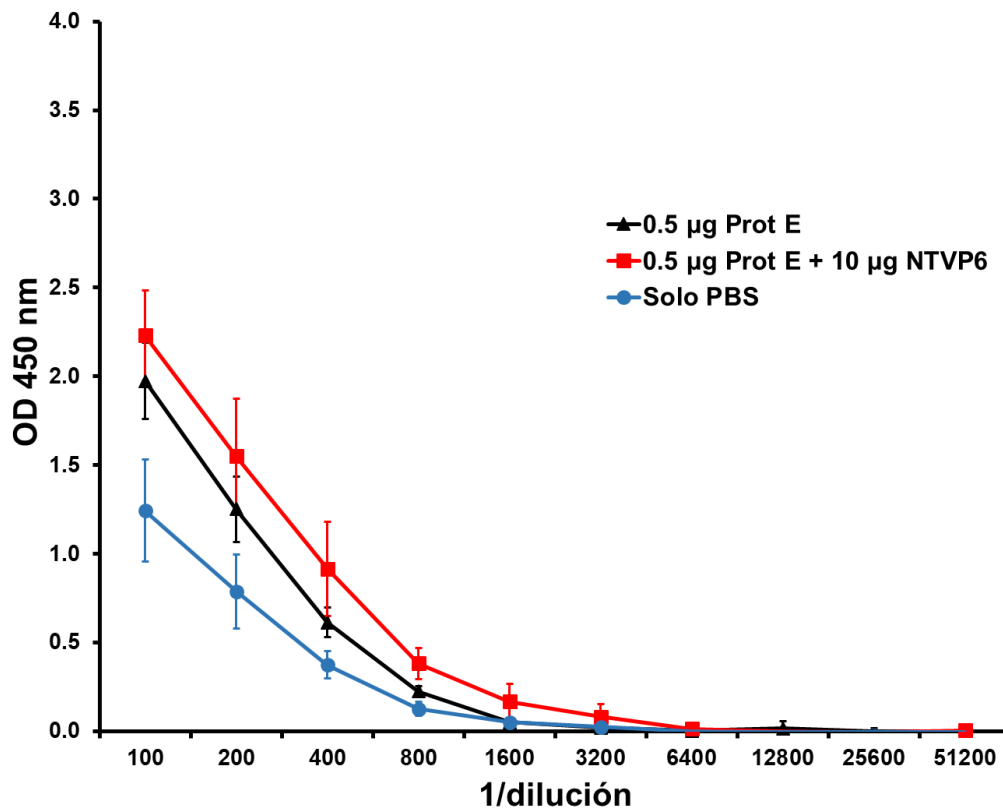


Figura 32. OD a 450 nm de diluciones seriadas de sueros de ratones del segundo diseño experimental para la detección de anticuerpos IgG específicos de la proteína E. Las curvas representan el promedio de los valores de absorbancia para cada grupo (n=5) y las barras de error representan la desviación estándar para los valores de absorbancia de sus respectivas diluciones.

Tabla 5. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del segundo diseño experimental.

Grupo	Inmunógeno	Media geométrica	IC 95%
1	0.5 µg Prot E	180.7	[153.7-212.3]
2	0.5 µg Prot E + 10 µg NTVP6	199.2	[122.8-323.1]
3	Solo PBS	175.9	[140.5-220.3]

Comparando la media geométrica de los títulos de cada grupo, no se observan diferencias considerables. La comparación entre los títulos de anticuerpo IgG específicos para la proteína E se muestra a través del gráfico de títulos para cada individuo de cada grupo (Figura 33).

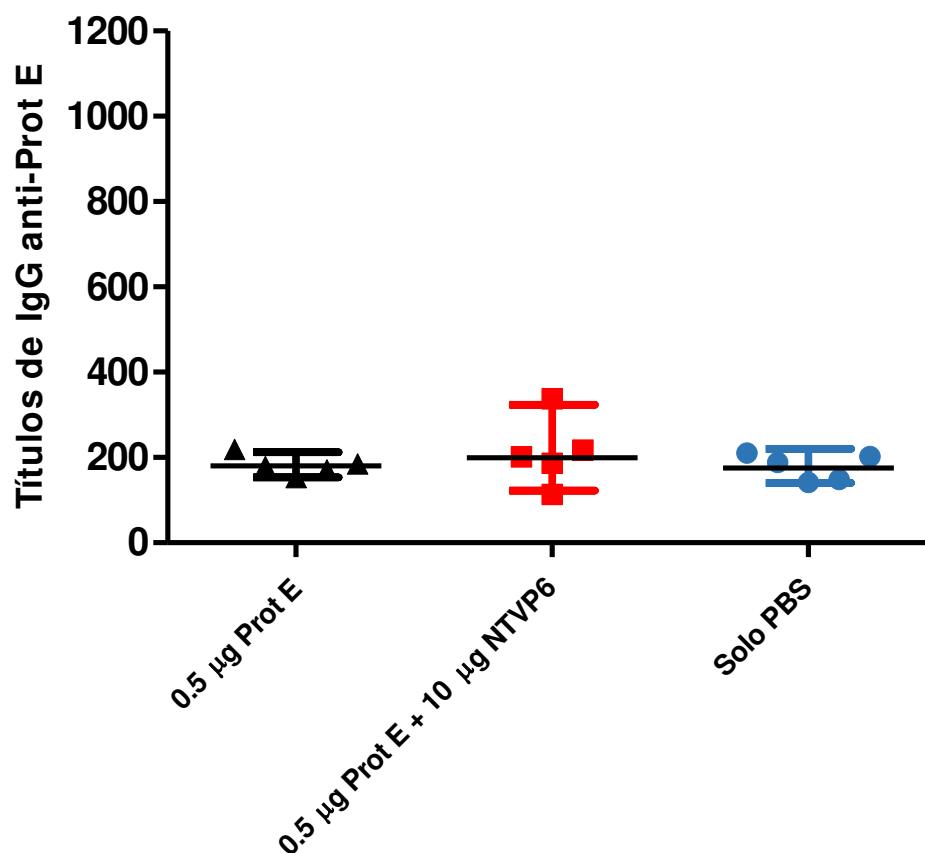


Figura 33. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del segundo diseño experimental. Los títulos calculados mediante el método de la curva sigmoide de cuatro parámetros se muestran por individuo y con la media geométrica para cada grupo (n=5). Las barras de error representan los intervalos de confianza del 95% para cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas (* $p < 0.05$) entre grupos se determinaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

En la figura 33 no se observan diferencias considerables entre los valores de títulos (p-valor = 0.4206 entre los grupos 1 y 2; y, p-valor = 0.6905 entre los grupos 1 y 3; p-valor = 0.6905 entre los grupos 2 y 3). A diferencia del primer diseño experimental, 0.5 µg de proteína E sola no indujo una respuesta inmune, como si lo hacen 10 µg de proteína E. Tampoco se observa una disminución en el título de anticuerpos específicos de proteína E al emplear 10 µg de NTVP6. En estas condiciones, no se observaron anticuerpos contra la proteína E.

7. DISCUSIÓN

Ante la necesidad de identificar o desarrollar nuevos adyuvantes comerciales, los NTVP6, los cuales en estudios preclínicos ya han demostrado ser adyuvantes para una vacuna contra NoV (Blazevic *et al.*, 2011), serían una excelente opción cuando el empleo de los adyuvantes comerciales existentes (por ejemplo, sales de aluminio) no son deseables (por ejemplo, en poblaciones pediátricas y geriátricas) por los efectos adversos que puedan causar (Batista-Duharte, 2012; Pasquale *et al.*, 2015). A diferencia de los adyuvantes comerciales actuales, los NTVP6 están formados solamente por proteína, y a la fecha estos no han demostrado ser citotóxicos en estudios *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2014; Malm *et al.*, 2016) ni generar efectos adversos en estudios de inmunización en murinos (Blazevic *et al.*, 2011; Pastor *et al.*, 2014; Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019).

Por otro lado, debido a que los NTVP6 han demostrado inducir una respuesta inmune protectora para “dosis subóptimas” de antígenos de VLPs de NoV (Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019); se podría emplear menos antígeno de interés para producir una dosis vacunal, y con esto se reducirían los costos de producción y el precio de las vacunas. Al reducirse la cantidad necesaria de antígeno para la producción de una dosis vacunal, también se podrían fabricar más dosis, y con esto evitar perjuicios por falta de vacunación en situaciones donde la producción actual no cubre la demanda. Con respecto al número de dosis necesarias (inmunización y refuerzos) para conferir protección, los resultados para VLPs de NoV (Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019) indicarían que con un refuerzo sería suficiente.

Además, al ser VP6 la proteína más inmunogénica del RV (Burns *et al.*, 1996), una vacuna que contenga a los NTVP6 como adyuvante sería una vacuna bivalente que podría brindar protección contra RV y contra otro patógeno. En el último reporte del grupo de Blazevic y Vesikari (Malm *et al.*, 2019) se demuestra que los NTVP6 son adyuvantes para dos VLPs de dos genogrupos distintos de NoV incluidas en la misma

formulación; por lo tanto, los NTVP6 podrían ser adyuvantes para uno, dos o más antígenos de interés incluidos en la misma formulación.

Durante el uso de los NTVP6 como adyuvante, se puede esperar que estos protejan al antígeno vacunal del medio biológico circundante, incrementen la vida media del antígeno, promuevan la liberación del antígeno de manera sostenida, minimicen la toxicidad sistémica, promuevan la entrega más eficiente del antígeno a las APC, desencadenen la activación de células T específicas de antígeno; en general, se espera que estimulen las respuestas inmune celulares y humorales innatas y adaptativas (Zhu *et al.*, 2014; Sun y Xia, 2016).

Entre las principales diferencias entre los trabajos del grupo de Vesikari y Blazevic (Blazevic *et al.*, 2011; Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019); y el presente estudio, se tiene al tipo de inmunógeno evaluado; ellos demostraron la actividad adyuvante de los NTVP6 sobre VLPs, los cuales son antígenos particulados; mientras en el presente estudio, el efecto de los NTVP6 se evaluó sobre la proteína E, la cual es un antígeno soluble; y este último es un tipo de antígeno menos inmunogénico que uno particulado (Snapper, 2018).

El grupo de Vesikari y Blazevic (Malm *et al.*, 2017) demostró que los NTVP6 evidencian mayor actividad adyuvante cuando se emplean “dosis subóptimas” de VLPs; y en el presente estudio por no conocerse *a priori* cual sería la “dosis subóptima” de proteína E para evidenciar la actividad adyuvante de los NTVP6, en un primer diseño experimental, se eligió la dosis de 10 µg de proteína E del ZikV, la cual sola ha demostrado ser insuficiente para inducir anticuerpos IgG específicos de la proteína E en la cepa de ratones Swiss Webster (SW), una cepa no consanguínea (To *et al.*, 2018), pero cuando esta dosis es coadministrada con adyuvantes sí se logra detectar anticuerpos IgG específicos de la proteína E en distintas cepas de ratones (Liang *et al.*, 2018; To *et al.*, 2018; Qu *et al.*, 2018). No hay reportes sobre si la dosis de 10 µg de proteína E del ZikV sola es capaz de inducir la producción detectable de anticuerpos IgG específicos, en la

cepa de ratones BALB/c, una cepa consanguínea que favorece a la inducción de la respuesta inmune humoral mediante la respuesta celular Th2 (Watanabe *et al.*, 2004). En el presente trabajo se esperaba que al coadministrar NTVP6 con 10 µg de proteína E, la producción de anticuerpos IgG específicos de la proteína E sea detectable por el método de ELISA o que este incremente como ya se ha observado, por ejemplo, cuando se aumenta de una dosis de 10 µg a 50 µg de proteína E del ZikV en coadministración con adyuvante (Liang *et al.*, 2018).

A diferencia de los reportes de actividad adyuvante de los NTVP6 del grupo de Vesikari y Blazevic (Blazevic *et al.*, 2011; Blazevic *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019), en los que evalúan la respuesta inmune a los 35 días post inmunización, en el presente trabajo la respuesta inmune humoral se evaluó a los 116 días post inmunización con la finalidad de evaluar la posible actividad adyuvante en relación con la memoria de la respuesta inmune.

En los resultados del primer diseño experimental del presente trabajo, se reporta por primera vez que la dosis de 10 µg de proteína E del ZikV sin coadministrarse con algún adyuvante fue suficiente para inducir la producción de anticuerpos detectables del tipo IgG específicos contra la proteína E en ratones de la cepa BALB/c. Y con respecto a la actividad adyuvante, en el primer diseño experimental, no se observó una actividad adyuvante de los NTVP6 sobre la inmunogenicidad de la proteína E; por el contrario, los resultados nos muestran que los NTVP6 se muestran inmunodominantes e interfieren con la respuesta inmune humoral hacia la proteína E. Este fenómeno de interferencia en la coadministración de antígenos ha sido reportado previamente (Siegrist, 2008; Findlow y Borrow, 2016), por ejemplo, la respuesta inmune específica de la cepa GI.1 de NoV interfiere con la respuesta específica de la cepa GII.4c al inmunizar con la coadministración de dosis iguales de VLPs de NoV de las cepas GI.1 y GII.4c, esta interferencia es corregida por el incremento de la dosis de VLPs GII.4c con respecto a la dosis de VLPs de GI.1 (relación 3:1) (Leroux-Roels *et al.*, 2017).

Lo deseable de un candidato a adyuvante, es que al emplearse no se induzca una respuesta contra este, y, sobre todo, que no interfiera con la respuesta inmune del antígeno de interés. Sin embargo, al ser los NTVP6 un nanomaterial formado por proteínas, se espera que este desencadene una respuesta inmune contra sí mismo, por ejemplo, como se observa en el trabajo de Pastor *et al.* (2014). Se ha reportado que otros adyuvantes no basados en proteína también inducen respuesta inmune contra sí mismos, por ejemplo, el escualeno (Matyas *et al.*, 2000).

En el primer diseño experimental al comparar los grupos experimentales 2 y 3, se observó que al duplicar la dosis de NTVP6 de 5 µg a 10 µg, la producción de anticuerpos IgG específicos contra la proteína E aumenta, aunque esta es menor que cuando se inmuniza con 10 µg de proteína E sola. Se pensó que pudo haber un error en la asignación de grupos, el cual se descartó al medir el nivel de anticuerpos contra los NTVP6 en ambos grupos. Este resultado, sugiere que los NTVP6 podrían tener una actividad adyuvante sobre el antígeno soluble proteína E, la cual no se evidencia en este diseño experimental. Debido a esto, se evaluó otro diseño experimental.

En el segundo diseño experimental, la dosis de proteína E se redujo a 0.5 µg para determinar si de esa manera se evidencia una actividad adyuvante de los NTVP6 que podría estar siendo enmascarada en el primer diseño experimental. Los resultados mostraron que el empleo de 0.5 µg de proteína E sola o en coadministración con 10 µg de NTVP6 fue insuficiente para detectarse producción significativa de anticuerpos IgG específicos de la proteína E.

No se observó actividad adyuvante bajo estos dos diseños experimentales, y esto puede deberse a que en el proceso de diálisis muchos de los NTVP6 se desensamblaron y quizá en forma de monómeros/trímeros no actúan como adyuvantes del antígeno soluble proteína E, y, al contrario, interfieren con la respuesta inmune específica de la proteína E. Otras posibles causas son que los NTVP6 no actuarían como adyuvantes

de antígenos solubles o que bajo estos diseños experimentales los NTVP6 no son adyuvantes de antígenos solubles.

Todos los estudios previos sobre la actividad adyuvante de los NTVP6 han sido realizados por el grupo de Vesikari y Blazevic (Blazevic *et al.*, 2011; Blazevic *et al.*, 2016; Malma *et al.*, 2016; Malm *et al.*, 2017; Malm *et al.*, 2019), y aunque se han realizado aportes importantes al entendimiento de esta actividad adyuvante, se necesitan más estudios para comprender mejor como efectúan su rol de adyuvantes, por ejemplo, como interactúan con el antígeno de interés a nivel molecular.

Por otro lado, en el presente estudio se tuvo un rendimiento bajo (2.28 mg/L) del proceso de producción/purificación de los NTVP6 en comparación al reportado (95.47 mg/L) en el trabajo de Plascencia-Villa *et al.* (2011); a pesar de que se empleó la misma metodología. Este bajo rendimiento fue un problema que se presentó durante el desarrollo de este trabajo y debido a esto, se tuvieron que repetir dos veces más los procesos de producción y purificación para obtener suficiente cantidad de NTVP6 para los fines del presente estudio. Se podría pensar que el bajo rendimiento y la baja producción podrían deberse a que se empleó un medio de cultivo diferente (PSFM) al empleado por Plascencia-Villa *et al.* (2011) (medio SF900 II, Invitrogen, EUA), o se trabajó con cultivos celulares de edad avanzada (pases celulares 56, 61 y 63). Previamente en nuestro grupo se han obtenido rendimientos bajos, los cuales fueron de 13.33 mg/L empleando el medio PSFM y con células de un pase 58 (Rivas, 2013); 3.22 mg/L empleando el medio SF900 II y un pase celular 54 (Rivas, 2013); y, 5 mg/L empleando el medio Ex-Cell 405 (Sigma-Aldrich, EUA) (Ríos, 2012). Recientemente, la Dra. Mabel Rodríguez de nuestro grupo de investigación (Laboratorio de Bioprocesos y Nanobiotecnología del IBt-UNAM) ha trabajado bajo las mismas condiciones empleadas en el presente trabajo y determinó que al cambiar de un pase celular ~30 a un pase 18, el rendimiento en la producción/purificación de NTVP6 aumentó aproximadamente de

1.67 mg/L a 19.6 mg/L (datos no publicados); lo cual sugiere trabajar con un pase celular bajo para aumentar el rendimiento del proceso.

Con respecto a los resultados del análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot, la pureza y la identidad de la proteína E comercial (>85%) se verificaron. El tamaño de la proteína E fue de ~54 kDa, y no de 50 kDa como se reporta para la proteína nativa de este virus y se muestra en resultados de SDS-PAGE por Kostyuchenko *et al.* (2016). No obstante, en los resultados mostrados en otros trabajos, esta diferencia de tamaño se debe a que la secuencia de la proteína E tiene alguna modificación como una etiqueta (“tag”) para facilitar su purificación, detección o para facilitar su producción en células de insecto, o incluso esta diferencia de tamaño podría deberse a que ésta presenta un patrón de glicosilación distinto del esperado por ser producida en el SCI-BV (Liang *et al.*, 2018; Shi y Jarvis, 2007). En el trabajo de Yang *et al.* (2018), se muestra que la proteína E del ZikV, producida en el sistema planta-*Agrobacterium tumefaciens*-virus del mosaico del tabaco (TMV), con una etiqueta de histidinas tiene un tamaño mayor a 50 kDa. El fabricante no especifica la cepa de ZikV de donde proviene la secuencia de la proteína E comercial, ni las modificaciones que pueda tener esta. Sin embargo, la identidad de ésta se pudo verificar por Western Blot y además otros estudios avalan su empleo (Pardi *et al.*, 2017; Rönnberg *et al.*, 2017).

8. CONCLUSIONES

- En las condiciones de diseños experimentales evaluadas no se determinó una actividad adyuvante de los nanotubos de VP6 sobre el antígeno soluble proteína E del virus Zika.
- Aunque los nanotubos de VP6 interfieren con la respuesta inmune hacia la proteína E del virus Zika, se observó un incremento significativo en la respuesta inmune hacia la proteína E al duplicarse la cantidad de 5 µg a 10 µg de nanotubos de VP6 coadministrados.
- Por primera vez se reporta la detección de anticuerpos IgG específicos contra la proteína E del virus Zika en sueros de ratones BALB/c inmunizados con 10 µg de proteína E del virus Zika sola.

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros diseños experimentales variando la formulación de las cantidades de proteína E del ZikV y de los NTVP6, por ejemplo, emplear 10 o 20 µg de proteína E y aumentar la cantidad de NTVP6 a 20 µg.
- Medir el título de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del ZikV en sueros colectados a 30, 45, 60, 90 días post inmunización o incluso a más tiempo del evaluado en el presente trabajo (más de 116 días post inmunización).
- Determinar el efecto de los NTVP6 sobre la producción de anticuerpos neutralizantes, respuesta inmune celular y la protección frente al reto con virus Zika infeccioso, en ratones coadministrados con proteína E del ZikV y NTVP6.
- Inmunizar ratones con VLPs formadas por las proteínas M y E del ZikV, y NTVP6 para determinar el efecto de los NTVP6 sobre la inmunogenicidad de las VLPs del ZikV.
- Comparar la actividad adyuvante de los NTVP6 con respecto a adyuvantes comerciales (por ejemplo, sales de aluminio).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila-Pérez, G., Nogales, A., Martín, V., Almazán, F., & Martínez-Sobrido, L. (2018). Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. *Viruses*, 10(11), 597.
- Awate, S., Babiuk, L. A. B., & Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology*, 4, 114.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Barouch, D. H., Thomas, S. J., & Michael, N. L. (2017). Prospects for a Zika virus vaccine. *Immunity*, 46(2), 176-182.
- Barrett, A. D. (2018). Current status of Zika vaccine development: Zika vaccines advance into clinical evaluation. *npj Vaccines*, 3(1), 24.
- Batista-Duharte, A. (2012). Vaccines and autoimmunity: a strange association under debate. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 29(2), 265-271.
- Blazevic, V., Lappalainen, S., Nurminen, K., Huhti, L., & Vesikari, T. (2011). Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine*, 29(45), 8126-8133.
- Blazevic, V., Malm, M., Arinobu, D., Lappalainen, S., & Vesikari, T. (2016). Rotavirus capsid VP6 protein acts as an adjuvant in vivo for norovirus virus-like particles in a combination vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(3), 740-748.
- Blázquez, A. B., & Saiz, J. C. (2016). Neurological manifestations of Zika virus infection. *World journal of virology*, 5(4), 135.
- Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P., & Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(5), e0005608.

Burns, J. W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A. A., & Greenberg, H. B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*, 272(5258), 104-107.

Calvet, G. A., Santos, F. B. D., & Sequeira, P. C. (2016). Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Current opinion in infectious diseases*, 29(5), 459-466.

Castro, R. M. (2014). Estudio del efecto de las especies reactivas de oxígeno en la producción y ensamblaje de ensamblados proteicos multiméricos. Tesis, Título Profesional de Doctor en Ciencias. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019. World Map of Areas with Risk of Zika. Disponible en:

<https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information>

(Consultado el 24 de julio del 2019)

Centro Nacional de Defectos Congénitos y Discapacidades del Desarrollo (NCBDDD)-Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), 2016. Datos sobre la microcefalia. Disponible en:

<https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/microcephaly.html> (Consultado el 24 de noviembre del 2019)

Colt, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Prinzo, Z. C. W., & Mehta, S. (2017). Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(4), e0005528.

Corthésy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Perez, N., Greenberg, H., & Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes

to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *Journal of virology*, 80(21), 10692-10699.

Dai, L., Wang, Q., Song, H., & Gao, G. F. (2018). Zika virus envelope protein and antibody complexes. In *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes* (pp. 147-168). Springer, Singapore.

Diamond, M. S., Ledgerwood, J. E., & Pierson, T. C. (2019). Zika virus vaccine development: progress in the face of new challenges. *Annual review of medicine*, 70, 121-135.

Du, S., Liu, Y., Liu, J., Zhao, J., Champagne, C., Tong, L., Zhang, R., Zhang, F., Qin, C. F., Ma, P., Chen, C. H., Liang, G., Liu, Q., Shi, P. Y., Cazelles, B., Wang, P., Tian, H., & Chen, C. H. (2019). Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature communications*, 10(1), 1324.

Erk, I., Huet, J. C., Duarte, M., Duquerroy, S., Rey, F., Cohen, J., & Lepault, J. (2003). A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus. *Journal of virology*, 77(6), 3595-3601.

Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(4), 410-449.

Fernandez, E., & Diamond, M. S. (2017). Vaccination strategies against Zika virus. *Current opinion in virology*, 23, 59-67.

Findlow, H., & Borrow, R. (2016). Interactions of conjugate vaccines and co-administered vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(1), 226-230.

Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., & Joshi, A. (2018). Recent advances in Zika virus vaccines. *Viruses*, 10(11), 631.

- Garg, H., Sedano, M., Plata, G., Punke, E. B., & Joshi, A. (2017). Development of virus-like-particle vaccine and reporter assay for Zika virus. *Journal of virology*, 91(20), e00834-17.
- Gong, D., Zhang, T. H., Zhao, D., Du, Y., Chapa, T. J., Shi, Y., Wang, L., Contreras, D., Zeng, G., Shi, P. Y., Wu, T. T., Arumugaswami, V., & Sun, R. (2018). High-throughput fitness profiling of Zika virus E protein reveals different roles for glycosylation during infection of mammalian and mosquito cells. *IScience*, 1, 97-111.
- Gulce-Iz, S., & Saglam-Metiner, P. (2019). Current State of the Art in DNA Vaccine Delivery and Molecular Adjuvants: Bcl-xL Anti-Apoptotic Protein as a Molecular Adjuvant. In *Immune Response Activation and Immunomodulation*. IntechOpen.
- Han, J. F., Qiu, Y., Yu, J. Y., Wang, H. J., Deng, Y. Q., Li, X. F., Zhao, H., Sun, H. X., & Qin, C. F. (2017). Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. *Scientific reports*, 7(1), 10047.
- Haque, A., Akçeşme, F. B., & Pant, A. B. (2018). A review of Zika virus: hurdles toward vaccine development and the way forward. *Antiviral therapy*, 23, 285-293.
- Hartman, H., Wang, Y., Schroeder Jr, H. W., & Cui, X. (2018). Absorbance summation: A novel approach for analyzing high-throughput ELISA data in the absence of a standard. *PloS one*, 13(6), e0198528.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S., Shi, J., & Lok, S. M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425.
- Kumar, S., Sunagar, R., & Gosselin, E. J. (2019). Bacterial Protein Toll-Like-Receptor Agonists: A Novel Perspective on Vaccine Adjuvants. *Frontiers in immunology*, 10, 1144.
- Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., Paolo, M. D. A., Iampietro, M. J., Badamchi-Zadeh, A., ... & Li, Z. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, 536(7617), 474.

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Cohe, J., & Rey, F. A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO journal*, 20(7), 1498-1507.

Leroux-Roels, G., Cramer, J. P., Mendelman, P. M., Sherwood, J., Clemens, R., Aerssens, A., De Coster, I., Borkowski, A., Baehner, F., & Van Damme, P. (2017). Safety and immunogenicity of different formulations of norovirus vaccine candidate in healthy adults: A randomized, controlled, double-blind clinical trial. *The Journal of infectious diseases*, 217(4), 597-607.

Lessler, J., Chaisson, L. H., Kucirka, L. M., Bi, Q., Grantz, K., Salje, H., Carcelen, A. C., Ott, C. T., Sheffield, J. S., Ferguson, N. M., Cummings, D. A. T., Metcalf, C. J. E., & Rodriguez-Barranquer, I. (2016). Assessing the global threat from Zika virus. *Science*, 353(6300), aaf8160.

Liang, H., Yang, R., Liu, Z., Li, M., Liu, H., & Jin, X. (2018). Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. *PloS one*, 13(3), e0194860.

Lin, H. H., Yip, B. S., Huang, L. M., & Wu, S. C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology advances*, 36(1), 47-53.

Malm, M., Diessner, A., Tamminen, K., Liebscher, M., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2019). Rotavirus VP6 as an Adjuvant for Bivalent Norovirus Vaccine Produced in *Nicotiana benthamiana*. *Pharmaceutics*, 11(5), 229.

Malm, M., Heinimäki, S., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2017). Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs. *Clinical & Experimental Immunology*, 189(3), 331-341.

Malm, M., Tamminen, K., Lappalainen, S., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2016). Rotavirus recombinant VP6 nanotubes act as an immunomodulator and delivery vehicle for norovirus virus-like particles. *Journal of immunology research*, 2016.

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B. V. V., Cohen, J., & Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The embo journal*, 20(7), 1485-1497.

Matyas, G. R., Wassef, N. M., Rao, M., & Alving, C. R. (2000). Induction and detection of antibodies to squalene. *Journal of immunological methods*, 245(1-2), 1-14.

Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., & Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current opinion in immunology*, 22(3), 411-416.

Méndez, N., Oviedo-Pastrana, M., Mattar, S., Caicedo-Castro, I., & Arrieta, G. (2017). Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015–2017. *Archives of Public Health*, 75(1), 65.

Modjarrad, K., Lin, L., George, S. L., Stephenson, K. E., Eckels, K. H., De La Barrera, R. A., Jarman, R. G., Sondergaard, E., Tennant, J., Ansel, J. L., Mills, K., Koren, M., Robb, M. L., Barret, J., Thompson, J., Kosel, A. E., Dawson, P., Hale, A., Tan, C. S., Walsh, S. R., Meyer, K. E., James, B., Crowell, T. A., Blazevic, A., Mosby, K., Larocca, R. A., Abbink, P., Boyd, M., Bricault, C. A., Seaman, M. S., Basil, A., Walsh, M., Tonwe, V., Hoft, D. F., Thomas, S. J., Barouch, D. H., & Michael, N. L. (2018). Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *The Lancet*, 391(10120), 563-571.

Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 487-524.

Palomares, L. A., Realpe, M., & Ramírez, O. T. (2015). An overview of cell culture engineering for the insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS). In *Animal Cell Culture* (pp. 501-519). Springer, Cham.

Pardi, N., Hogan, M. J., Pelc, R. S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C. R., Dowd, K. A., Sutherland, L. L., Searce, R. M., Parks, R., Wagner, W., Granados, A., Greenhouse, J., Walker, M., Willis, E., Yu, J. S., McGee, C. E., Sempowski, G. D., Mui, B. L., Tam, Y. K., Huang, Y. J., Vanlandingham, D., Holmes, V. M., Balachandran, H., Sahu, S., Lifton, M., Higgs, S., Hensley, S. E., Madden, T. D., Hope, M. J., Karikó, K., Santra, S., Graham, B. S., Lewis M. G., Pierson, T. C., Haynes, B. F., & Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 543(7644), 248.

Pasquale, A. D., Preiss, S., Silva, F. T. D., & Garçon, N. (2015). Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*, 3(2), 320-343.

Pastor, A. R., Rodríguez-Limas, W. A., Contreras, M. A., Esquivel, E., Esquivel-Guadarrama, F., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*, 32(24), 2874-2877.

Pimienta-Rodríguez, E. T., & Fando-Calzada, R. (2016). Vacunas experimentales contra el Zika. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(3).

Plascencia-Villa, G., Mena, J. A., Castro-Acosta, R. M., Fabián, J. C., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B*, 879(15-16), 1105-1111.

Qu, P., Zhang, W., Li, D., Zhang, C., Liu, Q., Zhang, X., Wang, X., Dai, W., Xu, Y., Leng, Q., Zhong, J., Jin, X., & Zhong, H. (2018). Insect cell-produced recombinant protein subunit vaccines protect against Zika virus infection. *Antiviral research*, 154, 97-103.

- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., Julander, J. G., Tang, W. W., Shresta, S., Pierson, T. C., Ciaramella, G., & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 168(6), 1114-1125.
- Ríos, B. I. (2012). Estudio de las propiedades mecánicas y polimorfismo de VP6 de rotavirus mediante ultrasonificación. Tesis de Licenciatura, Título Profesional de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rivas, M. A. (2013). Evaluación de medios de cultivo para la producción de una vacuna recombinante contra rotavirus. Tesis de Licenciatura, Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Rodríguez, M., Wood, C., Sanchez-López, R., Castro-Acosta, R. M., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of virology*, 159(5), 1005-1015.
- Roldao, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines*, 9(10), 1149-1176.
- Rönnerberg, B., Gustafsson, Å., Vapalahti, O., Emmerich, P., Lundkvist, Å., Schmidt-Chanasit, J., & Blomberg, J. (2017). Compensating for cross-reactions using avidity and computation in a suspension multiplex immunoassay for serotyping of Zika versus other flavivirus infections. *Medical microbiology and immunology*, 206(5), 383-401.
- Scheinberg, D. A., McDevitt, M. R., Dao, T., Mulvey, J. J., Feinberg, E., & Alidori, S. (2013). Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15), 2016-2022.
- Shan, C., Muruato, A. E., Jagger, B. W., Richner, J., Nunes, B. T., Medeiros, D. B. A., Xie, X., Nunes, J. G. C., Morabito, K. M., Kong, W. P., Pierson, T. C., Barrett, A. D., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Vasconcelos, P. F. C., Graham, B. S., Diamond, M. S., &

- Shi, P. Y. (2017b). A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nature communications*, 8(1), 676.
- Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D. B. A., Wakamiya, M., Tesh, R. B., Barrett, A. D., Wang, T., Weaver, S. C., Vasconcelos, P. F. C., Rossi, S. L., & Shi, P. Y. (2017a). A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature medicine*, 23(6), 763.
- Shi, X., & Jarvis, D. L. (2007). Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Current drug targets*, 8(10), 1116-1125.
- Siegrist, C. A. (2008). Blame vaccine interference, not neonatal immunization, for suboptimal responses after neonatal diphtheria, tetanus, and acellular pertussis immunization. *The Journal of pediatrics*, 153(3), 305-307.
- Snapper, C. M. (2018). Distinct immunologic properties of soluble versus particulate antigens. *Frontiers in immunology*, 9, 598.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50-64.
- Sun, B., & Xia, T. (2016). Nanomaterial-based vaccine adjuvants. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(33), 5496-5509.
- Tai, W., He, L., Wang, Y., Sun, S., Zhao, G., Luo, C., Li, P., Zhao, H., Fremont, D. H., Li, F., Jiang, S., Zhou, Y., & Du, L. (2018). Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-8.
- Thoryk, E. A., Swaminathan, G., Meschino, S., Cox, K. S., Gindy, M., Casimiro, D. R., & Bett, A. J. (2016). Co-administration of lipid nanoparticles and sub-unit vaccine antigens

is required for increase in antigen-specific immune responses in mice. *Vaccines*, 4(4), 47.

To, A., Medina, L. O., Mfuh, K. O., Lieberman, M. M., Wong, T. A. S., Namekar, M., Nakano, E., Lai, C. Y., Kumar, M., Nerurkar, V. R., & Lehrer, A. T. (2018). Recombinant Zika virus subunits are immunogenic and efficacious in mice. *MSphere*, 3(1), e00576-17.

Wang, Q., Yang, H., Liu, X., Dai, L., Ma, T., Qi, J., Wong, G., Peng, R., Liu, S., Li, J., Li, S., Song, J., Liu, J., He, J., Yuan, H., Xiong, Y., Liao, Y., Li, J., Yang, J., Tong, Z., Griffin, B. D., Bi, Y., Liang, M., Xu, X., Qin, C., Cheng, G., Zhang, X., Wang, P., Qiu, X., Kobinger, G., Shi, Y., Yan, J., & Gao, G. F. (2016). Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Science translational medicine*, 8(369), 369ra179-369ra179.

Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., & Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in Th1-and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, 22(5), 460-466.

World Health Organization (WHO), 2019. WHO vaccine pipeline tracker. Disponible en: https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/ (Consultado el 05 de septiembre del 2019)

Yang, M., Dent, M., Lai, H., Sun, H., & Chen, Q. (2017). Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine*, 35(33), 4287-4294.

Yang, M., Sun, H., Lai, H., Hurtado, J., & Chen, Q. (2018). Plant-produced Zika virus envelope protein elicits neutralizing immune responses that correlate with protective immunity against Zika virus in mice. *Plant biotechnology journal*, 16(2), 572-580.

Zhu, X., Li, C., Afridi, S. K., Zu, S., Xu, J. W., Quanquin, N., Yang, H., Cheng, G., & Xu, Z. (2018). E90 subunit vaccine protects mice from Zika virus infection and microcephaly. *Acta neuropathologica communications*, 6(1), 77.

Zou, J., & Shi, P. Y. (2017). Adulthood sequelae of congenital Zika virus infection in mice. *EBioMedicine*, 20, 11-12.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Constancia de aprobación del Comité de Bioética del IBt-UNAM bajo el proyecto N° 331.



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ref. Comité de Bioética, *Proyecto: 331*

A QUIEN CORRESPONDA

Por este conducto se hace constar que el proyecto **"DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE UNA VACUNA DE LA PROTEÍNA E RECOMBINANTE DEL VIRUS ZIKA FORMULADA CON NANOTUBOS DE VP6 COMO ADYUVANTE"**, después de ser revisado por el Comité de Bioética de este Instituto fue **"APROBADO"** por cumplir con los lineamientos y Reglamentos de este Comité.

El proyecto fue sometido a evaluación por Arturo Liñan Torres, bajo la supervisión de la Doctora Laura Alicia Palomares Aguilera, Investigadora Titular "C" del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuernavaca, Mor., a 02 de diciembre de 2019.
PRESIDENTE DE COMITÉ DE BIOÉTICA



DRA. ELENA ARRIAGA ARELLANO



EAA*



AV. UNIVERSIDAD 2001. COL. CHAMILPA
C.P. 62210 CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO
TELS. (5255) 5622 7600 - (777) 329 1600
www.ibt.unam.mx

ANEXO 2. Títulos de anticuerpos en los sueros preinmunes del primer diseño experimental.

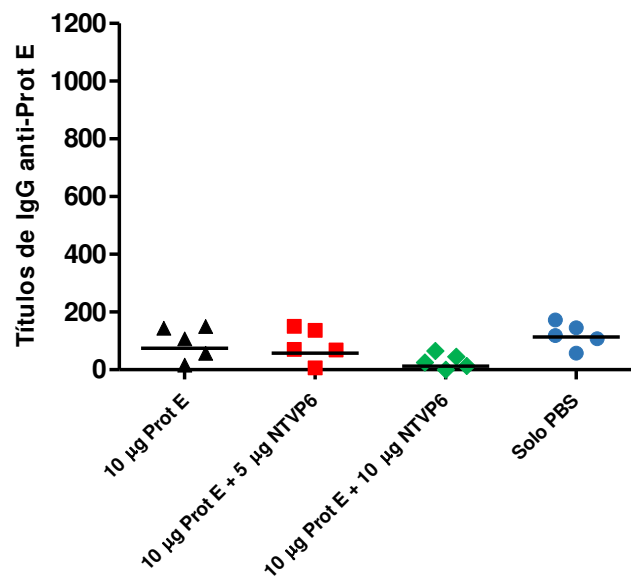


Figura 34. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del ZikV en los sueros preinmunes del primer diseño experimental.

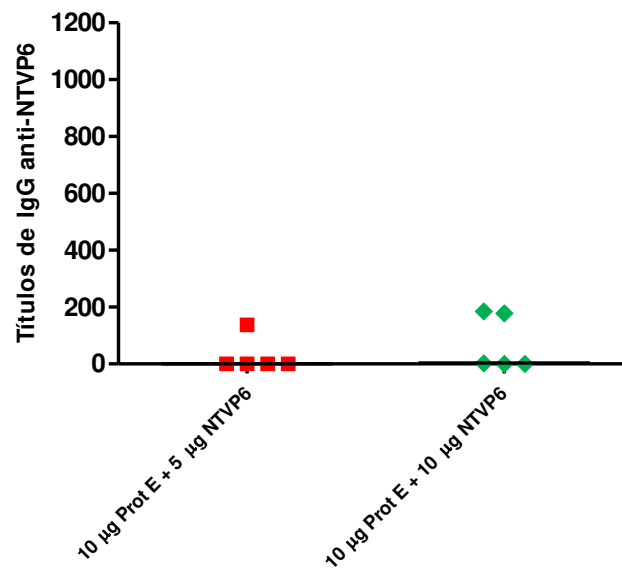


Figura 35. Títulos de anticuerpos IgG específicos de los NTVP6 en los sueros preinmunes de los grupos 2 y 3 del primer diseño experimental.

ANEXO 3. Títulos de anticuerpos en los sueros preinmunes del segundo diseño experimental.

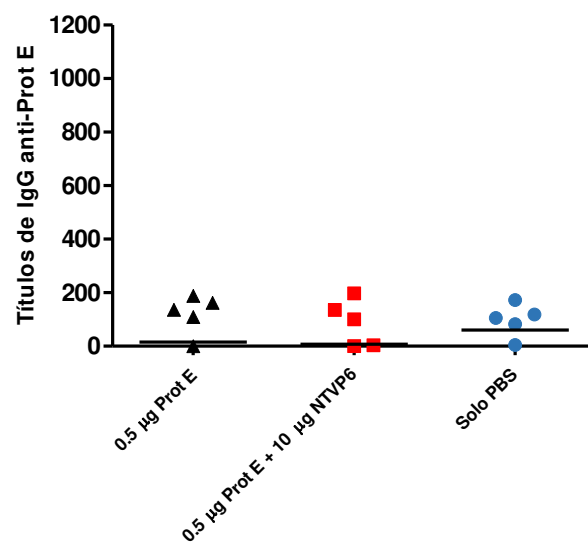


Figura 36. Títulos de anticuerpos IgG específicos de la proteína E del ZikV en los sueros preinmunes del segundo diseño experimental.